



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEOLARES
FIBRILARINA, NUCLEOLINA Y NUCLEOFOSMINA
DURANTE LA PROFASE MEIÓTICA 1 EN TESTÍCULO
DE RATA ADULTA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

JESÚS ROBERTO VILLALOBOS ARELLANO



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROSARIO ORTIZ HERNÁNDEZ

2017

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1.- Datos del alumno

Apellido paterno	Villalobos
Apellido materno	Arellano
Nombre(s)	Jesús Roberto
Teléfono	55-55-56-29
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	31059384-1

2.- Datos del tutor

Grado	Dra
Nombres(s)	Rosario
Apellido paterno	Ortiz
Apellido materno	Hernández

3.- Datos del sinodal 1

Grado	Dr
Nombres(s)	Luis Felipe
Apellido paterno	Jiménez
Apellido materno	García

4.- Datos del sinodal 2

Grado	Dra
Nombres(s)	Lourdes Teresa
Apellido paterno	Agredano
Apellido materno	Moreno

5.- Datos del sinodal 3

Grado	Dra
Nombres(s)	Patricia
Apellido paterno	Rivas
Apellido materno	Manzano

6.- Datos del sinodal 4

Grado	Dra
Nombres(s)	Olga Margarita
Apellido paterno	Echeverría
Apellido materno	Martínez

7.- Datos del trabajo escrito

Título	Distribución de proteínas nucleolares Fibrilarina, Nucleolina y Nucleofosmina durante la profase meiótica I en testículo de rata adulta
Número de páginas	79 p
Año	2017

Índice

Abreviaturas	1
Índice de tablas	2
Índice de imágenes	3
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	
Aparato reproductor masculino	7
Gametogénesis	8
Espermatogénesis	8
Mitosis	9
Meiosis	10
Marcador meiótico (Complejo sinaptonémico)	12
Proteínas meióticas	12
Proteína del complejo sinaptonémico 1 (SYCP1)	13
Proteína del complejo sinaptonémico 3 (SYCP3)	14
Nucléolo	15
Ribosomas	16
Regiones organizadoras del nucléolo (NOR's)	17
Componentes del nucléolo	18
Proteínas nucleolares	19
Nucleofosmina	20
Nucleolina	21
Fibrilarina	22
Nucléolo en Mitosis	22
Nucléolo en Meiosis	24

Justificación	25
Hipótesis	25
Objetivos	
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
Material y Métodos	
Obtención del material biológico	26
Procesamiento del material biológico para técnicas histológicas	26
Procesamiento del material biológico para técnicas citogenéticas	26
Tinciones aplicadas a las técnicas histológicas y citogenéticas	27
Tinción de impregnación argéntica	27
Anticuerpos para cortes	27
Anticuerpos para dispersiones	27
Observación de las muestras	28
Cuantificación celular	28
Resultados	
Impregnación argéntica	29
Cuantificación celular	32
Inmunodetecciones	34
Discusión	52
Conclusión	58
Referencias	59
Anexos	67

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosómico
AgNOR	Técnica argéntica para regiones organizadoras del nucléolo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARN pol I	ARN polimerasa I
ARN pol II	ARN polimerasa II
ARNr	ARN ribosómico
BrdU	Bromodeoxiuridina (nucleótido que se incorpora durante la fase S)
B23	Nucleofosmina (proteína del componente granular)
C23	Nucleolina (proteína del componente fibrilar denso)
CF	Centro fibrilar del nucléolo
CFD	Componente fibrilar denso del nucléolo
CG	Componente granular del nucléolo
CPN	Cuerpos prenucleolares
CS	Complejo sinaptonémico
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole (afinidad al ADN)
EA	Elemento axial del complejo sinaptonémico
EC	Elemento central del complejo sinaptonémico
EL	Elemento lateral del complejo sinaptonémico
ENC	Complejo proteico transmembranal que enlace al núcleoesqueleto con el citoesqueleto
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína (fluorocromo)
FT	Filamento transverso del complejo sinaptonémico
GAR	Región rica en residuos de glicina, arginina y fenilalanina
H ₂ O _d	Agua destilada
KASH5	Proteína externa de la membrana nuclear asociada con microtúbulos
MAJIN	Proteína de anclaje a membrana

NORs	Regiones organizadoras del nucléolo
NPM1	Nucleofosmina (proteína del componente granular)
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
pre-ARNr	Precursor de ARN ribosómico
REC8	Cohesina específica del proceso meiótico
RNPs	Ribonucleoproteínas
RT	Rojo Texas (fluorocromo)
SMC1	Cohesina 1 de mantenimiento estructural
SMC3	Cohesina 3 de mantenimiento estructural
SPO11	Topoisomerasa (participa en los dobles rompimientos de ADN)
SYCE1	Proteína 1 del elemento central del complejo sinaptonémico
SYCE2	Proteína 2 del elemento central del complejo sinaptonémico
SYCE3	Proteína 3 del elemento central del complejo sinaptonémico
SYCP1	Proteína del complejo sinaptonémico 1 (componente principal del EC)
SYCP2	Proteína del complejo sinaptonémico 2 (componente del EL)
SYCP3	Proteína del complejo sinaptonémico 3 (componente principal del EL)
TERB1	Proteína 1 de formación de <i>bouquet</i> y de unión a secuencias teloméricas
TERB1	Proteína 2 de formación de <i>bouquet</i> y de unión a secuencias teloméricas
TEX12	Proteína específica de la meiosis (formación del elemento central)
TRF1	Factor de unión a repeticiones teloméricas (TTAGGG)
UBF	Factor de unión upstream (factor de transcripción)

Índice de tablas

N° de Tabla	Título
Tabla 1	Características y funciones del nucléolo
Tabla 2	Relación entre los dominios nucleolares su contenido y su función
Tabla 3	Distribución de varios componentes constitutivos de los dominios dependiendo el tipo de nucléolo
Tabla 4	Número de cúmulos de AgNOR por célula de acuerdo a la etapa de la profase meiótica I (RESULTADOS)

Índice de imágenes

N° de Figura	Pie de figura
Figura 1	Esquema del testículo en vertebrados y magnificación del túbulo seminífero
Figura 2	Esquema de un corte transversal del túbulo seminífero
Figura 3	Representación del proceso de espermatogénesis y la carga genética
Figura 4	Esquema comparativo entre la división meiótica y mitótica
Figura 5	Etapas de la profase meiótica I
Figura 6	Sinapsis de homólogos y ensamblaje del CS durante la profase meiótica I
Figura 7	Ensamblaje del complejo sinaptonémico
Figura 8	Procesamiento del pre-ARN en eucariontes
Figura 9	Componentes del ribosoma eucarionte
Figura 10	Estructura del cromosoma acrocéntrico
Figura 11	Regionalización de la actividad transcripcional y post-transcripcional dentro del nucléolo
Figura 12	Organización de los dominios de la proteína NPM1
Figura 13	Organización de los dominios de la proteína C23
Figura 14	Esquema del desensamblaje y ensamblaje del nucléolo durante la mitosis
Figura 15	Diagrama del modelo de trabajo desde la obtención de la muestra hasta el análisis de resultados
Figura 16	Corte transversal de túbulo seminífero con método de AgNOR (RESULTADOS)
Figura 17	Dispersiones de túbulo seminífero con método de AgNOR (RESULTADOS)
Figura 18	Promedio del número de fragmentos nucleolares en cada tipo celular de la profase meiótica I, agrupado las etapas del paquiteno (RESULTADOS)
Figura 19	Promedio del número de fragmentos nucleolares en cada tipo celular de la profase meiótica I, separando las etapas del paquiteno (RESULTADOS)
Figura 20-25	Corte transversal de túbulo seminífero con inmunodetección doble de proteínas nucleolares (RESULTADOS)
Figura 26-34	Dispersiones de túbulo seminífero con inmunodetección doble de proteína meiótica y nucleolar (RESULTADOS)

Resumen

El nucléolo es un dominio nuclear de carácter ribonucleoprotéico con una funcionalidad muy diversa, en la que destaca la biogénesis de ribosomas. Este dominio está formado por tres componentes que son, el centro fibrilar (CF), el componente fibrilar denso (CFD) y el componente granular (CG). Cada componente está constituido por ARN y proteínas específicas del nucléolo. Durante la división celular tipo mitosis, el nucléolo transita por un proceso llamado nucleologénesis, en el cual sus componentes se desensamblan para después reensamblarse y restablecer sus funciones. Durante la profase meiótica, el CF migra a su cromosoma acrocéntrico, mientras que los componentes CFD y CG forman estructuras llamadas cuerpos prenucleolares. Mientras que en la telofase se reorganizan los componentes y restablecen sus funciones para formar al nucléolo. Las células de la línea germinal entran en un proceso especializado de división, conocido como la meiosis. Durante la cual, los cromosomas homólogos sufren cambios estructurales que permiten el intercambio de material genético, que es fundamental para la producción de variabilidad genética en organismo de reproducción sexual. Mientras que la dinámica del nucléolo ha sido ampliamente caracterizada durante la profase mitótica, en la profase meiótica I poco se ha estudiado. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es describir la dinámica de las proteínas del nucléolo durante la profase meiótica I en testículo de rata adulta.

En este trabajo, se utilizaron cortes de parafina y dispersiones de células en profase meiótica de testículo de rata adulta. Se realizó la identificación de los estadios mediante las asociaciones celulares del ciclo del epitelio seminífero y la formación de una estructura característica de la profase meiótica I, el Complejo Sinaptonémico. Mediante inmunocitoquímica fluorescente se identificaron los componentes del nucléolo en cortes de parafina y en dispersiones de células en profase meiótica I. Se inmunolocalizó el CF por medio del anticuerpo anti-Fibrilarina, al CFD mediante el anticuerpo anti-Nucleolina y al CG mediante el anticuerpo anti-Nucleofosmina (NPM1).

Los resultados evidencian que los espermatocitos primarios en toda la profase meiótica I, presentan las diferentes proteínas que indica la presencia de fragmentos nucleolares (contienen componentes del nucléolo), ya que en las fases de preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno temprano, medio, tardío y diploteno, se identificó la colocalización de marcadores para dos de los tres componentes nucleolares. Es importante señalar que el análisis estadístico indicó una tendencia a la reducción del número de fragmentos nucleolares conforme avanza la profase meiótica I.

Por lo que en este trabajo reportamos la dinámica del nucléolo durante la profase meiótica I en espermatocitos primarios de rata adulta. El nucléolo se presenta como fragmentos durante las etapas iniciales de la profase. Dichos fragmentos nucleolares al parecer se unifican en el transcurso de la profase hasta formar una sola identidad hacia el final de la profase meiótica I.

Abstract

The nucleolus is a nuclear domain mainly composed of ribonucleoprotein. Among its many functions, ribosomes biogénesis stands out. This nuclear compartment has three components, the fibrillar center (FC), the dense fibrillar component (DFC) and the granular component (GC), and each component consists of several nucleolar specific proteins. Throughout mitosis the nucleolus undergoes a dissembling and reassembling process also know as nucleologenesi. During the mitotic prophase, the FC migrates to its acrocentric chromosome, whereas the DFC and GC components form structures called prenucleolar bodies. Then during the telophase, nucleolar components are reassembled and nucleolus function is restore. Germ line cells divide by specialized division process, known as meiosis. Homologoues chromosomes undergo structural changes that allow them to Exchange genetic material, process that is essential to produce genetic variability in sexually reproducing organisms. Although broadly characterized during mitotic prophase, nucleolus dynamics has been poorly studied during the meiotic prophase I. Thus, the aim of this work has been to describe the dynamics of the nucleolus components during the meiotic prophase I of adult rat testis.

Paraffin sections and spreading of cell in meiotic propases from adult rat testis were used. The stages were identified through the associations of the cycle of the seminiferous epithelium and the Synaptonemal Complex that is a meiotic prophase I specific structure. Nucleolus components were identified by immunofluorescence on testis sections and on primary meicytes spreads. The FC component was immunolocalized by anti-Fibrillarlin antibody, DFC by anti-Nucleolin antibody and GC by anti-Nucleophosmin (NPM1) antibody.

The results evidenced that the primary spermatocytes throughout the meiotic prophase I, present the different proteins that indicate the presence of nucleolar fragments, because in the phases of preleptoten, leptoteno, cigoteno, early, middle, late and diplotene was positive to markers for two of the three nucleolar components. It is important to say that the statistical analysis indicated a tendency to reduce the number of nucleolar fragments as the meiotic prophase I advances.

In summary, here we described the dynamics of the nucleolus during the meiotic prophase I of adult rat testis. The nucleolus is observed as fragments during the initial stages of the prophase. It seems that these nucleolus fragments converge as the prophase continues until they become a unit at the end of the meiotic prophase I.

Introducción

Aparato Reproductor Masculino en Vertebrados

El aparato reproductor masculino está constituido por las gónadas y los órganos accesorios sexuales (órgano copulador, glándulas y conductos) (Figura 1). Las gónadas en machos son los testículos, que se encargan de la formación de gametos (gametogénesis), síntesis y liberación de hormonas (esteroidogénesis) que son necesarias para el funcionamiento de los órganos sexuales **(en Gartner y Hiatt, 2002; en Boron y Boulpaep, 2012)**.

El epitelio seminífero presenta varias capas de células y se compone de 2 tipos de células, las de Sertoli y las células de la línea germinal (Figura 2). Las células de Sertoli apoyan, protegen y nutren a las células espermatogénicas, fagocitan residuos citoplásmicos, secretan proteínas, hormonas y establecen la barrera hematotesticular. Asimismo, estas células presentan características morfológicas y celulares particulares, donde se puede destacar un núcleo oval acompañado con su nucléolo central bien definido **(Russell y col., 1990; en Gartner y Hiatt, 2002; en Brusco y col., 2014)**. Por otro lado, las células germinales serán las que llevarán el proceso de espermatogénesis, el cual se divide en 3 fases: proliferativa o mitosis, meiosis y espermiogénesis **(en Boron y Boulpaep, 2012)**.

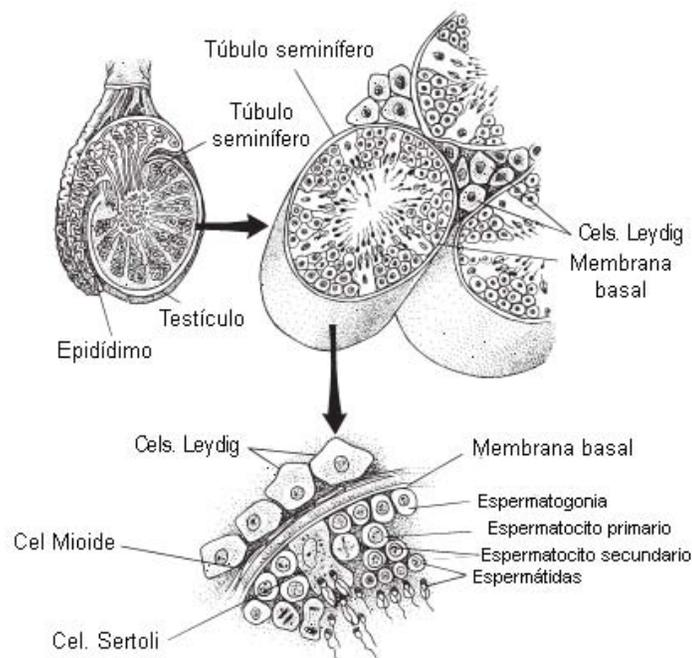


Figura 1. Esquema de un corte sagital de un testículo y magnificación de un túbulo seminífero. Tomado y modificado de Kardong K. V., 2012.

Gametogénesis

En los organismos con reproducción sexual se da la formación de gametos, originados por el proceso meiótico. En mamíferos dichos gametos se conocen como espermatozoides para organismos machos y óvulos para las hembras. Dichos gametos haploides al unirse forman un nuevo organismo con el juego cromosómico diploide característico de la especie.

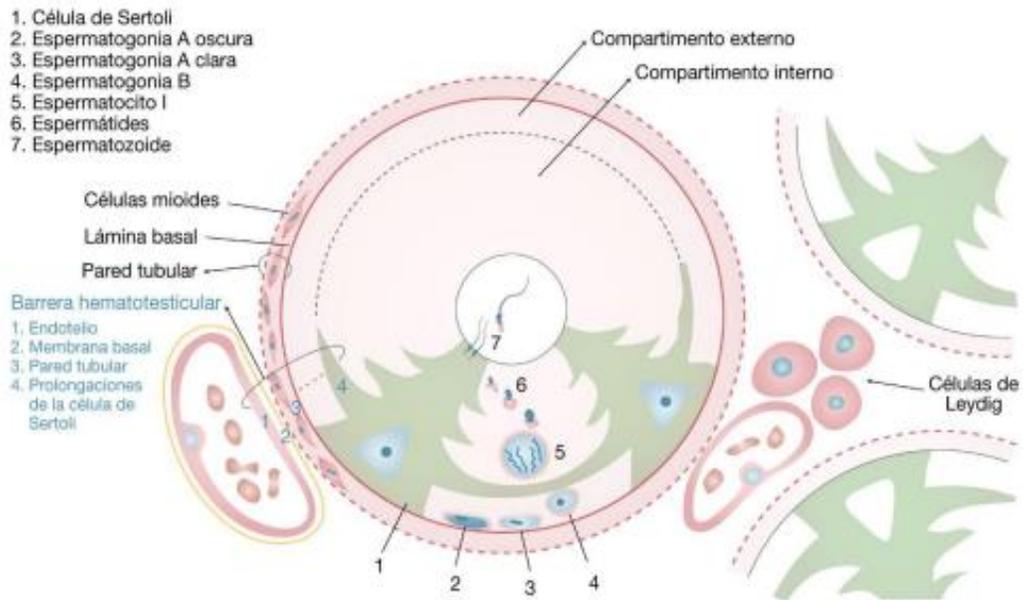


Figura 2. Esquema de un corte transversal de túbulo seminífero donde se indican los tipos celulares del epitelio seminífero y la constitución del intersticio. Tomado de Brusco y col, 2014.

Espermatogénesis

Este proceso responsable de la formación del gameto masculino lleva a las células germinales inmaduras a su maduración mediante tres fases características que se conocen como: la fase “proliferativa o de mitosis” donde las espermatogonias crecen y se diferencian hasta los espermatocitos primarios los cuales entrarán a la siguiente fase, la de “meiosis” donde ocurrirá el entrecruzamiento, diferenciándose en espermatocitos secundarios, generando como resultado final de esta fase cuatro células haploides llamadas espermátidas que entraran a la última fase, la “espermiogénesis”, donde estas células sufrirán cambios morfológicos y fisiológicos provocando su maduración y formación del gameto masculino, el espermatozoide (en Alberts y col., 2008) (Figura 3).

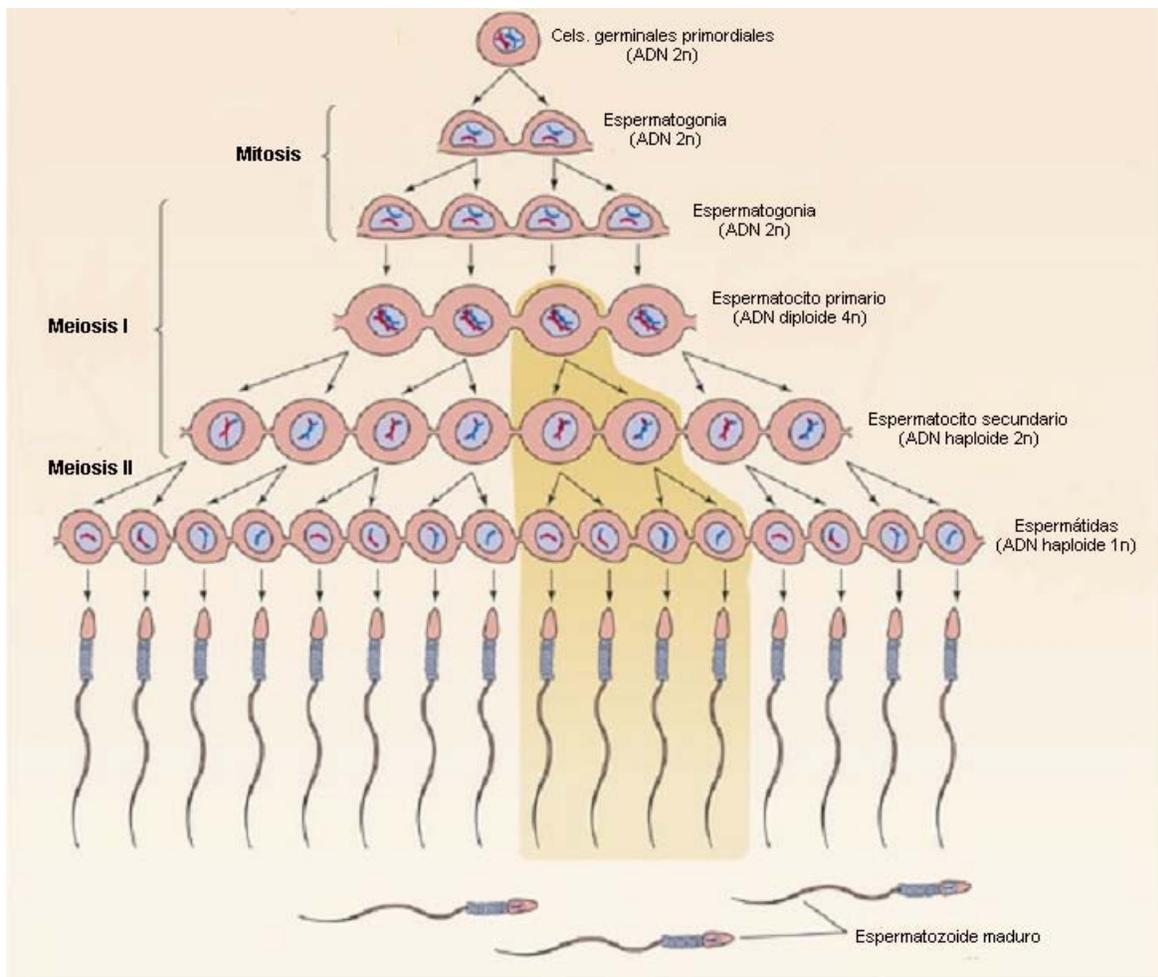


Figura 3. Representación del proceso de espermatogénesis y número cromosómico. Tomado y modificado de Boron y Boulpaep, 2012.

Mitosis

Durante la espermatogénesis, específicamente en las fases de proliferación o mitosis y meiosis se llevan a cabo dos divisiones celulares, la mitosis y la meiosis. La palabra mitosis se acuñó en el siglo XIX por Flemming (1882) y hace referencia a un proceso de división nuclear, donde las moléculas replicadas de ADN se reparten equitativamente en dos células hijas, las cuales tendrán un contenido genético idéntico al de la célula madre de la cual provienen. Dicho proceso puede ocurrir en células haploides o diploides como sucede en las espermatogonias, como resultado de este proceso las actividades metabólicas (transcripción y traducción) se detienen y la célula no responde a estímulos externos. Dependiendo el autor, la mitosis se divide de 4 a 6 etapas que son: la profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (en Karp y col., 2008).

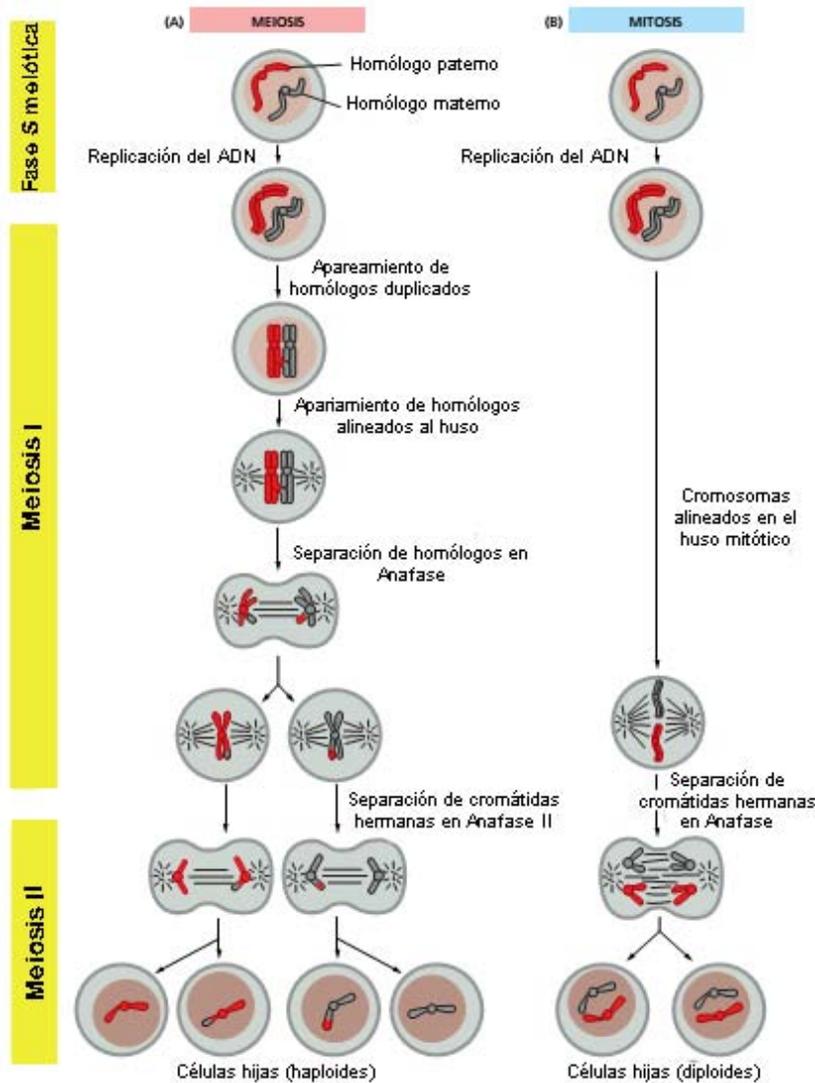


Figura 4. Esquema comparativo entre la división meiótica y división mitótica. Tomado y modificado de Alberts y col., 2008.

Meiosis

La palabra meiosis se acuñó en el siglo XX por Farmer y Moore (1905) y hace referencia a la reducción del contenido de ADN hacia una fase haploide para recuperar el estado diploide tras la fecundación **(en Karp y col., 2008)**. La meiosis en células germinales comienza con una ronda de replicación de ADN para lograr “2n duplicado” para cada cromosoma que consiste en un par de cromátidas hermanas, seguido de esto, las células transitan por una fase de síntesis de ADN denominada fase S pre-meiótica **(Velasco, 2012)** antes de entrar en meiosis I (espermatocitos primarios) y meiosis II (espermatocitos secundarios) **(en Cohen &**

Holloway, 2015) (Figura 4).

La fase S pre-meiótica es más larga que la fase S pre-mitótica. Algunos autores proponen que la duración de la fase de síntesis meiótica está relacionada con ciertos genes como SPO11 y REC8 en levaduras. En el caso de la rata, la fase S pre-meiótica tiene una duración de 84.1 horas y en humanos es de 62.4 horas, esta duración se piensa se debe al establecimiento de relaciones para la recombinación y la correcta segregación de los cromosomas homólogos **(Muñoz-Velasco et al., 2013)**.

La meiosis I (reduccional) consiste en profase I, metafase I, anafase I y telofase I. Durante este proceso los cromosomas homólogos maternos y paternos se unen y ocurre sinapsis y después se lleva a cabo el intercambio de información genética, llamado recombinación. La meiosis II (ecuatorial) consiste en metafase II, anafase II y telofase II; siendo similar a la mitosis, en donde los pares de cromátidas hermanas se separan y dan como resultado el mismo número total de cromosomas en las células hijas **(en Cohen & Holloway, 2015)**.

La profase I de la primera división meiótica se divide en 5 etapas generales, que se definen por sus características morfológicas y celulares **(Schramm y col., 2011; en Hunter, 2013)**. Sin embargo, hay autores que mencionan transiciones entre una etapa y otra o dependiendo del tiempo de la etapa clasificándolos en temprano, medio y tardío. Las etapas generales son las siguientes **(en Karp y col., 2008)** (Figura 5)

- 1) *Leptoteno*. La cromatina se organiza en ejes cromosómicos **(Harper y col., 2004; Schramm y col., 2011)**. Las cromátidas hermanas se organizan en una estructura llamada elemento axial (EA) **(Hernández-Hernández y col., 2009)**.
- 2) *Cigoteno*. Los cromosomas homólogos comienzan asociarse (sinapsis) **(Schramm y col., 2011)** y para ello se da la formación del *bouquet* (reorganización de cromosomas en forma de racimo) **(Harper y col., 2004)**. Esta sinapsis está acompañada por el inicio de la formación del complejo sinaptonémico que es necesario para la recombinación genética **(en Karp y col., 2008)**.
- 3) *Paquiteno*. En el paquiteno temprano persiste el *bouquet*, mientras que en el paquiteno medio la formación del complejo sinaptonémico se completa y ocurre el entrecruzamiento o recombinación. Para el paquiteno tardío comienza el desensamblado del complejo sinaptonémico **(Harper y col., 2004)**. Bajo el microscopio electrónico se observan nódulos de recombinación donde se dará el entrecruzamiento, estos nódulos se encuentran al centro del complejo sinaptonémico **(en Karp y col., 2008)**.
- 4) *Diploteno*. Se reconoce por la disolución del complejo sinaptonémico **(en Karp y col., 2008)**.
- 5) *Diacinesis*. Los cromosomas presentan una fase final de condensación **(Harper y col., 2004)** y se mantienen unidos en puntos específicos con forma de X, llamados quiasmas, estos últimos son sitios donde ocurrió el entrecruzamiento **(Schramm y col., 2011)**.

La membrana nuclear comienza a fragmentarse y los microtúbulos del huso empiezan a desarrollarse y conectarse con los cinetocoros de los homólogos para separarse. Esta fase termina con la desintegración de la membrana y movimiento de las tétradas (**en Karp y col., 2008**).

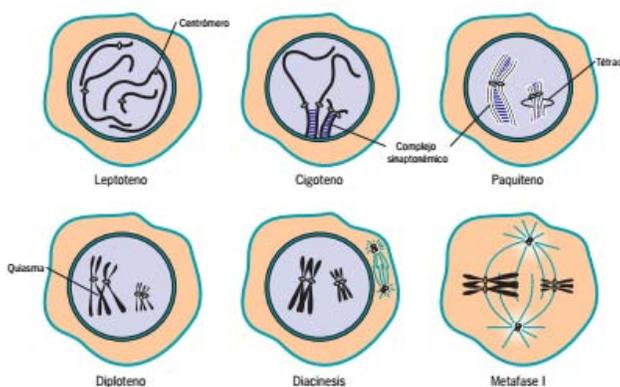


Figura 5. Etapas de la profase meiótica I. Tomada de Karp y col., 2008.

Marcador meiótico (complejo sinaptonémico)

Una estructura característica del proceso meiótico es la formación del complejo sinaptonémico (CS), el cual permite la sinapsis y entrecruzamiento de los cromosomas. Esta estructura es específica del núcleo y está compuesta por proteínas. El CS consiste en tres componentes: dos elementos laterales (ELs) y un elemento central (EC) (**Kouznetsova, et al., 2011**). Sin embargo, **Lu y col. (2014)** mencionan que los tres componentes del complejo sinaptonémico son: el elemento lateral, el elemento central y los filamentos transversos. Los ELs están asociados con un par de cromátidas hermanas y con una región central compuesta por filamentos transversos (FT) y el EC (**Schramm y col., 2011**).

Proteínas meióticas

Los componentes del complejo sinaptonémico están constituidos por proteínas meióticas específicas que se presentan conforme avanza la profase meiótica I. En preleptoteno las cromátidas hermanas comienzan a unirse por medio de cohesinas como SMC1, SMC3 y REC8, mientras que en leptoteno las proteínas SYCP2 y SYCP3 forman el elemento axial (EA). SYCP2 es requerida para unirse a SYCP3; en ratones machos, la ausencia de SYCP2 provoca esterilidad por una falla en la formación del CS y en hembras causa reducción de la camada. Sin embargo, la ausencia de SYCP3 en hembras causa aneuploidias por la deficiente

segregación cromosómica. En cigoteno se forma el elemento transverso, el cual es un enlace entre el elemento lateral y el elemento central. SYCP1 es el único componente caracterizado en los filamentos transversos y se ha demostrado que la ausencia de SYCP1 provoca modificación en el ancho del CS e incluso la falla en el ensamblado. En los últimos años se han descrito proteínas pertenecientes al elemento central como SYCE1, SYCE2, SYCE3, TEX12 y C14ORF39/SIX6OS1 que permiten el ensamblaje total del complejo sinaptonémico en paquiteno (**revisado en Costa, y col., 2005; Lu, y col., 2014; Gómez, y col., 2016**) (Figura 6).

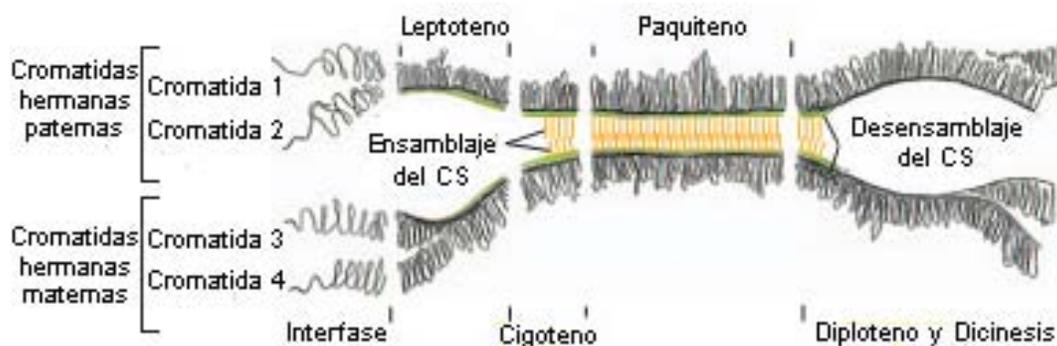


Figura 6. Sinapsis de homólogos y ensamblaje del complejo sinaptonémico durante los diferentes estadios de la profase meiótica I. Tomado y modificado de Alberts y col., 2008.

Proteína del complejo sinaptonémico 1 (SYCP1)

Es una proteína con un dominio central con alfa hélices confiriendo un aspecto de resorte y con dos dominios globulares en los extremos amino terminal (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal). Esta proteína forma homodímeros con orientación paralela al C-terminal anclado al EL y al N-terminal anclado al EC (Figura 7). Existen dos funciones principales de SYCP1 durante el ensamblaje del CS: 1) la interrupción del gen de *sycp1* en ratón provoca esterilidad en los dos sexos, el cual es causado por eventos masivos de apoptosis durante la espermatogénesis y ovogénesis. Estudios realizados en ratones carentes de *sycp1* evidenciaron una falla en la sinapsis en los cromosomas homólogos. Por otro lado, SYCP1 es necesaria para el entrecruzamiento y para la reparación de los rompimientos de doble cadena de ADN. 2) en sistemas heterólogos, las moléculas de SYCP1 tienen la capacidad de autoensamblarse y formar estructuras que se asemejan al CS (**Schramm y col., 2011**).

Proteína del complejo sinaptonémico 3 (SYCP3)

Esta proteína es esencial para el ensamblaje del EA y es una proteína estructural dentro del EL que consiste en un dominio central α -helicoidal y regiones C-terminal y N-terminal (Figura 7). El dominio α -helicoidal se piensa que puede formar estructuras enrolladas. En condiciones experimentales SYCP1 y SYCP3 tienen la capacidad de autoensamblarse y formar nuevas estructuras que se asemejan a regiones del CS (**Fraune y col., 2012**).

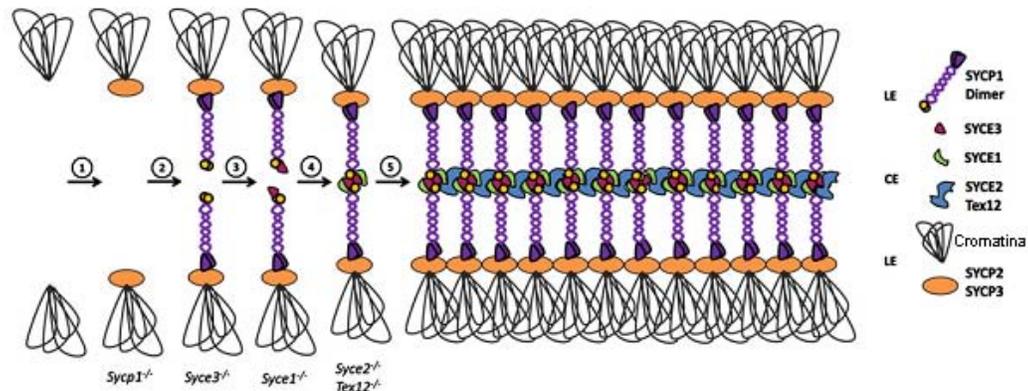


Figura 7. Ensamblaje del complejo sinaptonémico. Tomado y modificado de Fraune y col., 2012.

Los estudios realizados sobre mitosis y meiosis han denotado un gran interés sobre los ácidos nucleicos, las proteínas citoplásmicas y nucleares, así como las proteínas nucleolares, además de ribonucleoproteínas y otras moléculas presentes en las células germinales durante la espermatogénesis. Las proteínas nucleolares hacen referencia a proteínas que controlan diferentes etapas de la biogénesis de ribosomas (transcripción del ADNr y procesamiento del pre-ARNr) pero que no están presentes en el ribosoma maduro (**Gerbi y col., 2003**).

A su vez, las ribonucleoproteínas (RNPs) son estructuras electrodensas compuestas de proteínas y ARN presentes en el núcleo celular y en el citoplasma. El término aplica para diversos cuerpos nucleares, entre los que destaca el nucléolo (ver Tabla 1). Actualmente se conocen varios cuerpos nucleares ribonucleoprotéicos que llevan a cabo una diversidad de funciones reguladoras, transductoras y de maduración del ARN (**Biggiogera y col., 2004; Mao et al., 2011**).

Tabla 1. Características y funciones del nucléolo. Tomado y modificado a partir de Mao et al., 2011.

	Número promedio por célula	Tamaño promedio (µm)	Componentes determinantes	Funciones
Nuécleolo	1-4	0.5 – 8.0	Nucleolina, Fibrilarina, UBF, ARN Pol I, B23	Biogénesis de ribosomas, regulación de la transcripción de genes ribosomales, homeostasis general, señalización de vías de estrés, envejecimiento celular, enfermedades.

Nuécleolo

El nucléolo es un organelo no membranoso ribonucleoprotéico exclusivo de células eucariontes, constituye un dominio nuclear altamente dinámico y plurifuncional (**Boisvert y col., 2007; Peruquetti y col., 2007**) relacionado con el metabolismo, la transcripción, la maduración y el ensamble de ribosomas, la maduración del ARN, el ciclo celular, la muerte celular programada y respuesta al estrés (**en Olson, 2004; Szecheng y col., 2006**). Se ha demostrado que durante la división celular el nucléolo se disgrega, para su posterior reorganización en las células hijas. Este proceso de desensamblado y reensamblado del nucléolo se ha denominado nucleologénesis (**Hernandez-Verdun, 2006**). Este evento ha sido muy estudiado durante la mitosis, sin embargo, para células en meiosis no se ha investigado con profundidad. Los primeros registros que se realizaron del nucléolo datan del siglo XVIII, los cuales no vislumbraron la funcionalidad y complejidad de esta estructura.

Las células eucariontes tienen al menos un nucléolo, el cual puede presentar variaciones en tamaño y número dependiendo de la actividad transcripcional del ADNr de la célula regulada por la presencia de proteínas (**Hernandez-Verdun, 2011; Peruquetti y col., 2012**). Se sabe que el nucléolo es el sitio de formación de los precursores moleculares de los ribosomas, específicamente de la producción de ARNs ribosomales 18S, 5.8S y 28S (Figura 8), sintetizados por ciertos genes que se encuentran organizados en “tándem” localizados en las regiones organizadoras nucleolares (NOR’s) (**Berrios, 1998; Leary y Huang, 2001; Prieto y McStay, 2005**).

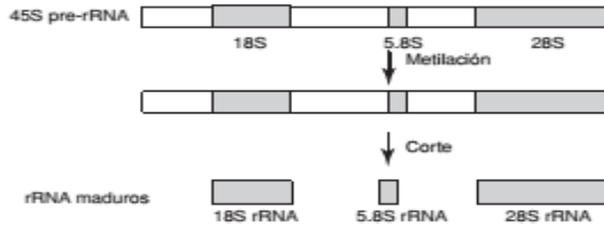


Figura 8. Procesamiento del pre-ARN en eucariontes. Tomada de Jiménez y Merchant, 2003

Ribosomas

El ribosoma es una estructura ribonucleoproteica que se compone de dos subunidades denominadas pequeña y grande. Son tres las clases de ribosomas más estudiadas: ribosomas de eubacterias, arqueobacterias y eucariontes; en los tres casos estas estructuras llevan básicamente la misma función de traducción. Los ribosomas de organismos eucariontes está formado por dos subunidades que se conocen como 40S y 60S, la subunidad pequeña de 40S contiene 34 proteínas y contiene una molécula de ARN conocida como 18S, mientras que la subunidad grande de 60S contiene 49 proteínas aproximadamente y tres moléculas diferentes de ARN conocidas como 28S, 5S y 5.8S. A partir de un solo precursor llamado pre-ARNr con coeficiente de sedimentación 45S, se forman los ARNr del ribosoma (Figura 9) **(en Jiménez y Merchant, 2003).**

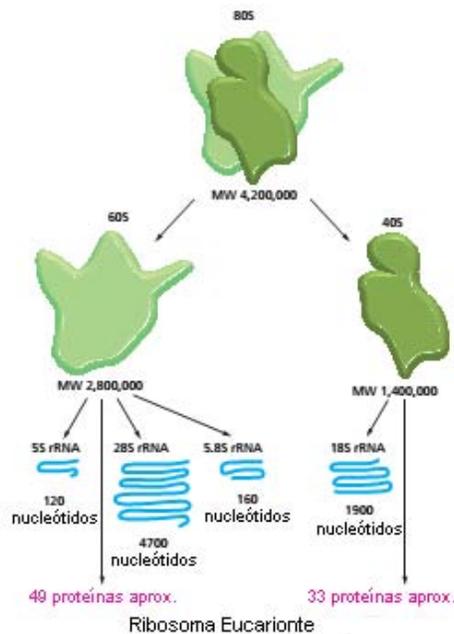


Figura 9. Componentes del ribosoma eucarionte. Tomado y modificado de Alberts y col., 2008.

Regiones organizadoras del nucléolo (NORs)

Las regiones organizadoras del nucléolo (NORs) son segmentos de ADN que contiene los genes ribosomales y un conjunto de proteínas ácidas no histónicas donde se precipitan las sales de plata (**Tretê, 2000**), lo que los hace idóneos para su localización histológica. Los NORs se asocian a ciertos cromosomas, dichos cromosomas presentan constricciones primarias (centrómeros) y constricciones secundarias que serán las regiones donde se asociarán los NOR's (Figura 10). Los cromosomas se clasifican de acuerdo con el tamaño de los brazos, metacéntricos o mediales (ambos brazos iguales), submetacéntricos o submediales (cada brazo tiene un tamaño diferente) y acrocéntricos o telocéntricos (con uno de los brazos casi inapreciable) (**en Gómez-Álvarez y col, 2002**).

Estudios sobre el marcaje de cromosomas y su evolución en el orden Rattini, evidenció la localización de las regiones organizadoras del nucléolo. El número de NORs presentes en *Rattus norvegicus* es de tres y se localizan en los cromosomas 3, 11 y 12 (**Hofgärtner et al., 1979; Canet y col., 2001; Badenhorst y col., 2011**). Mientras que en humanos el número de NORs son cinco, en los cromosomas 13, 14, 15, 21, 22 (**Canet y col., 2001; Branco y Pombo, 2007; Stimpson et al., 2014**).

El nucléolo, se forma alrededor de los genes ribosomales a partir de organizadores nucleolares (NOR's) y conforma una morfología tripartita o bipartita. La formación del nucléolo requiere del precursor de ARNr 45S, formado por la ARN polimerasa I (Figura 8). Los NOR's parecen guiar la unión de los cuerpos prenucleolares (CPN), los cuales contienen componentes del nucléolo (**Fromont-Racine y col., 2003; Hernandez-Verdun, 2011**).

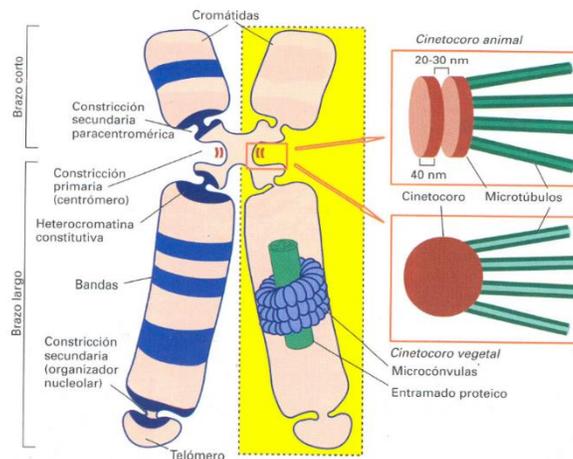


Figura 10. Estructura del cromosoma acrocéntrico. Tomado de Gómez-Álvarez y col., 2002.

Componentes del nucléolo

El nucléolo está constituido por tres componentes o dominios: el centro fibrilar (CF) donde se localizan los genes ribosomales (ADNr), el componente fibrilar denso (CFD) en el cual se lleva a cabo la transcripción del ARN ribosomal 47S y el procesamiento temprano del ARNr generando las subunidades pequeñas del ribosoma y finalmente el componente granular (CG) donde se lleva a cabo el procesamiento tardío del ARNr, lo que genera las subunidades grandes del ribosoma. Se ha demostrado que el comienzo de la transcripción del ADNr ocurre en el límite del CF-CFD (**Berrios, 1998; Hernández-Verdun, 2011**) (Figura 11).

El arreglo que muestran los componentes nucleolares fueron detallados por **Mosgoeller y Schwarzacher (2000)**, quienes describen al centro fibrilar (CF) del nucléolo como una región con estructura globular constituida por una red de fibrillas de 4 a 5 nm, mientras que el componente fibrilar denso (CFD) está conformado por regiones de fibrillas de 3 a 5 nm y que suele rodear al CF. Esta distribución del CFD y CF la denominaron “núcleolo reticulado o nucleolonema”. Por último, el componente granular está constituido por gránulos de 10-20 nm de diámetro que rodea al CFD.

Finalmente, el número, la forma, tamaño y composición del nucléolo tendrá variaciones entre especies y entre tipos celulares, dichas variaciones dependen de la demanda de ribosomas. Por ejemplo, en vertebrados amniotas como mamíferos, aves y algunos reptiles (cocodrilos, serpientes y lagartos) la composición del nucléolo es tripartita, es decir, con el CF, CFD y CG (**Mao et al., 2011; Thiry y col., 2011**); mientras que, en peces cartilaginosos, peces óseos,

anfibios y otros reptiles (tortugas) podemos encontrar al nucléolo bipartita, es decir, con una zona fibrilar y una zona granular (**Lamaye y col., 2011; Thiry y col., 2011**). Asimismo, otros organismos eucariontes como anélidos, moluscos, artrópodos (*Drosophila hydei*), equinodermos, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), hongos, plantas (*Zea mays*) y protistas (*Giardia muris*, *Giardia lamblia* y *Trypanosoma cruzi*) presentan un tipo de nucléolo bipartita (**López-Velazquez y col., 2005; Thiry y Lafontaine, 2005; Jimenez-García y col., 2008; Weis y col., 2015**)

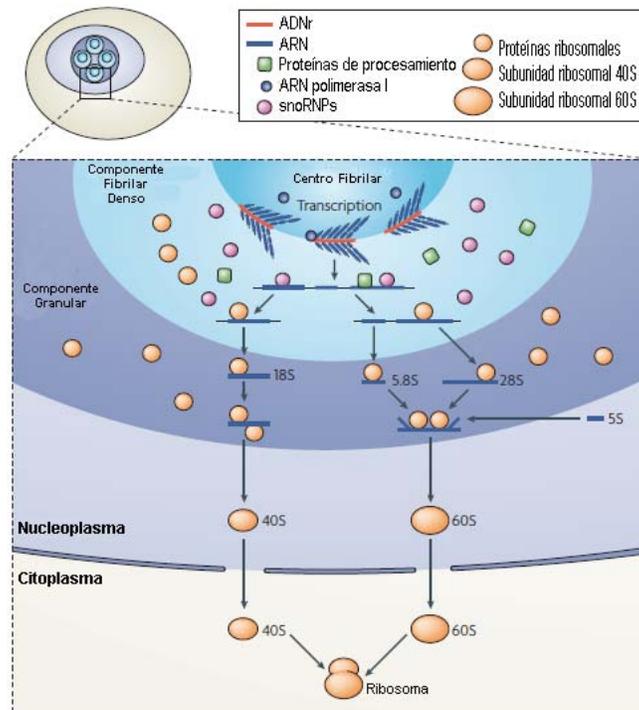


Figura 11. Regionalización de la actividad transcripcional y post-transcripcional dentro del nucléolo. Tomado y modificado de Boisvert, 2007.

Proteínas nucleolares

Los análisis proteómicos han permitido caracterizar el proteoma nucleolar y con ello la cantidad de proteínas nucleolares ha aumentado en la última década de 100 proteínas a más de 6,000 proteínas nucleolares en humanos y más de 200 proteínas en plantas (**en Olson, 2011**). Cada dominio nucleolar está conformado por ciertas proteínas que pueden compartir con otros dominios o ser específicos de uno solo (ver Tabla 2). Además, cada dominio puede presentar una distribución aleatoria de los componentes constitutivos dependiendo si el nucléolo es bi o tripartita (Tabla 3) (**Thiry y Lafontaine, 2005**).

Tabla 2. Relación entre los dominios nucleolares, su contenido y su función. Tomado de Berrios, 1998.

Dominio	Función	Contenido
Centro fibrilar	Almacenamiento de ADNr inactivo y proteínas	ADNr, ARN Pol I, UBF, topo I
Componente fibrilar denso	Actividad transcripcional y procesamiento temprano	ADNr, ARNr, UBF, topo I, fibrilarina, nucleolina, NOPP 140 y NAP 57
Componente granular	Procesamiento, empaquetado y almacenamiento de preribosomas	ARNr, B23, nucleolina, S6 ribosomal, NO 55, NOP 52

Tabla 3. Distribución de varios componentes constitutivos de los dominios dependiendo el tipo de nucléolo. Tomado de Thiry y Lafontaine, 2005.

Componentes	Nuécleo bipartita	Nuécleo tripartita
ADN (incluye ADNr)	F	CF
Proteínas de AgNOR	F	CF + CFD
ARN Pol I	F	CF
UBF	F	CF + CFD
ADN Topo I	-	CF
Fibrilarina	F	CFD
Nucleolina	F + G	CFD + CG
Proteína ribosomal 1S	G	CG
Ribocarina	G	CG
ARNr	F + G	CF + CFD +CG

Algunas de estas proteínas son afines a la plata, lo cual es el fundamento para la técnica de AgNOR, entre las proteínas que sobresalen al marcaje encontramos la ARN polimerasa I (transcripción del ADNr), la nucleolina, B23, fibrilarina, entre otras (**Treré, 2000; Canet y col., 2001**).

Nucleofosmina

La proteína B23, NPM1 o también descrita como numatrina en mamíferos y NO38 en anfibios es una fosfoproteína ácida abundante en el nucléolo, específicamente del CG (**Mitrea et al., 2016**). Esta proteína presenta diversos dominios con distintas propiedades bioquímicas, estructurales y funcionales. El dominio N-terminal (1-120 residuos) es el más conservado dentro de la familia de proteínas “NPM” además de ser una región hidrofóbica. La región con

zonas ácidas A1 (121-132 residuos) y A2 (160-188 residuos) presentan residuos de aspartato y glutamato, además de tener una propiedad electrostática. El dominio básico (189-243 residuos) enriquecido en residuos de lisina y arginina que le confieren una propiedad electrostática. Finalmente, el dominio C-terminal (244-294 residuos) que contiene la señal de localización nucleolar que es importante para el transporte núcleo-citoplasma, asimismo contiene residuos aromáticos que son de relevancia para la localización nucleolar de la nucleofosmina (Figura 12). Algunas funciones fisiológicas de la NPM1 son: como chaperona, en la biogénesis de ribosomas, regulación de la transcripción, inhibición de la apoptosis, regulación del ciclo celular, mantenimiento de la estabilidad genómica y como modulador de supresores tumorales; así como algunas modificaciones post-traduccionales en las que está involucrada son: la fosforilación, desfosforilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación (Colombo y col., 2005; en Olson, 2011).



Figura 12. Organización de los dominios de la proteína NPM1. NES (señal de exportación nuclear), NLS (señal de localización nuclear), NoLS (señal de localización nucleolar). Tomado y modificado de Box et al., 2016.

Nucleolina

La nucleolina o C23 es una de las fosfoproteínas más abundantes en el nucléolo y se encuentra en el CFD (Mongelard y Bouvet, 2006) y tiene 700 residuos de aminoácidos que se diferencian en 3 dominios con diferentes funciones: el dominio N-terminal (300 residuos aprox.) contiene secuencias ácidas repetidas de glutamato-aspartato separadas por zonas básicas, además controla la transcripción del ARNr; el dominio central contiene cuatro dominios de unión a ARN y controla el procesamiento del pre-ARNr, y el dominio C-terminal es rico en residuos de glicina, arginina y fenilalanina, también controla la localización nucleolar (Figura 13) (Lo et al., 2006; en Olson, 2011). La principal función de la nucleolina es la biogénesis de ribosomas, estando implicada en diferentes etapas del proceso, tanto en la transcripción (ARN Pol I) como en el procesamiento del pre-ARNr, también en el ensamblaje y transporte al citoplasma de partículas ribosómicas. Por otra parte, se ha descrito su implicación en otros procesos como son el mantenimiento de la estructura de la cromatina, la regulación de la transcripción (ARN Pol II), la replicación del ADN, la estabilidad y traducción del ARNm y el

procesamiento temprano y tardío (Fibrilarina-CFD y B23-CG) además de los ARN pre-ribosómicos parcialmente procesados salen del nucléolo. Durante la metafase, la mayoría de los componentes de procesamiento están asociados con los cromosomas formando una región pericromosomal que contiene componentes de procesamiento de ARNr, como ribonucleoproteínas, pequeños ARN nucleolares, pre-ARNr, fibrilarina y nucleofosmina.

En la anafase, los componentes de procesamiento citoplásmico son empaquetados en cúmulos derivados del nucléolo mientras que los otros componentes permanecen en la vecindad de los cromosomas; en la anafase tardía los niveles de ciclina B1-CDK1 disminuyen drásticamente, por lo que se da la reactivación de la transcripción de ADNr mediante las fosfatasa PP1 y PP2A. Una vez en la telofase, los cúmulos derivados del nucléolo disminuyen y comienzan a formarse los cuerpos prenucleolares (CPNs) cerca de los cromosomas y las regiones pericromosomales se disgregan y sus componentes de procesamiento migran a los CPNs. El nucléolo comienza a reorganizarse en los NORs de los cromosomas acrocéntricos y finalmente en la telofase tardía, la envoltura nuclear se reintegra, mientras que se reubican de forma ordenada los componentes de procesamiento temprano y tardío, siendo el CFD y posteriormente el CG. Al final de la mitosis la maquinaria necesaria para ensamblar al nucléolo es heredada a las células hijas (Figura 14) (Boisvert y col., 2007; Hernandez-Verdun, 2011; Olson, 2011; Lara-Martínez et al., 2016; Nepomuceno-Mejía et al., 2016).

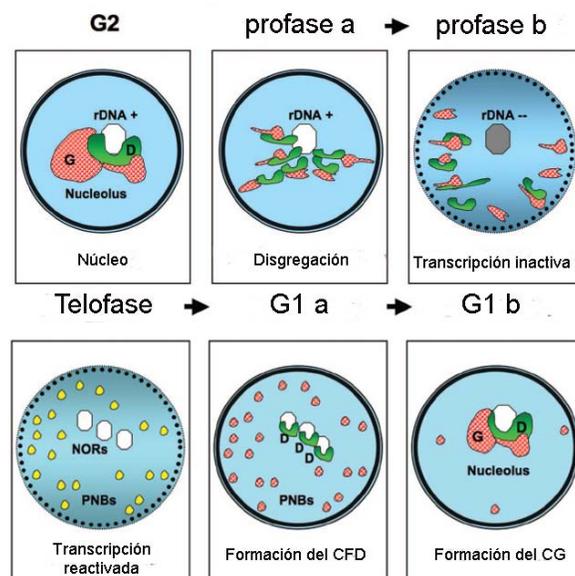


Figura 14- Esquema del desensamblaje y ensamblaje del nucléolo. Tomado y modificado de Hernández-Verdun, 2011.

Nucléolo en meiosis

Durante la espermatogénesis se presentan modificaciones en el citoplasma, en el núcleo y algunas de ellas en el nucléolo; se sabe que muchas modificaciones en el nucléolo ocurren durante la profase meiótica y en la espermiogénesis. En los espermátocitos primarios en fases de preleptoteno, leptoteno y cigoteno se presentan nucléolos pequeños con una composición tripartita; por otro lado, en los espermátocitos en paquiteno temprano y medio se observan nucléolos 9 veces más grandes al tamaño inicial con una composición tripartita; asimismo en espermátocitos en paquiteno tardío los nucléolos se compactan presentando los tres componentes, mientras que en espermátocitos secundarios los nucléolos son compactos y pequeños hasta que en espermátidas elongadas el nucléolo desaparece (**Schultz y Leblond, 1990**).

Algunos estudios trataron de esclarecer si el nucléolo tiene actividad durante la espermatogénesis, encontrando que existe un pico de actividad transcripcional en paquiteno medio (**Soderstrom, 1976**), sin embargo, **Tres (1975)** concluyó que existe poca actividad en leptoteno, se incrementa en cigoteno tardío y posteriormente hay una disminución en paquiteno tardío. Por otro lado, **Schultz y Leblond (1990)** mencionan que la actividad transcripcional es poca en espermátocitos en preleptoteno, leptoteno y cigoteno, mientras que en paquiteno temprano se incrementa la actividad transcripcional, existiendo un pico en paquiteno medio y finalmente una disminución en paquiteno tardío. El nucléolo no presenta actividad transcripcional en espermátocitos secundarios y espermátidas.

En contraste a estas observaciones, investigaciones realizadas empleando el método de impregnación argéntica de los NORs (Ag-NOR), que permite medir la actividad transcripcional de los genes ARNr; demostraron que hay marca positiva durante toda la profase meiótica, mientras que en metafase I y II hay ausencia de marca y reaparece en espermátidas tempranas (**Schmid et al., 1982**).

Justificación

En la división celular tipo meiosis se ha descrito la fragmentación del nucléolo en las etapas tempranas de la profase meiótica sin que hasta el momento se defina la dinámica de los cambios que se llevan a cabo en los componentes nucleolares. Sigue siendo una interrogante cómo y por qué se fragmenta el nucléolo al inicio de la profase meiótica y qué determina su reorganización al final de la profase. Por tal motivo en este trabajo se pretende describir la distribución de las proteínas nucleolares fibrilarina, nucleolina y nucleofosmina características de los componentes nucleolares durante la profase meiótica I.

Hipótesis

Durante la profase meiótica I, los cromosomas transitan por modificaciones estructurales y movimientos que permiten la sinapsis entre homólogos, mientras que el nucléolo durante esta etapa se fragmenta; por lo que habrá fragmentos nucleolares marcados con fibrilarina, nucleolina y nucleofosmina, asociados a los cromosomas y por lo tanto con sus movimientos.

Objetivos

Objetivo General

- Determinar la distribución de proteínas específicas del nucléolo como Fibrilarina, Nucleolina y Nucleofosmina durante la profase meiótica I.

Objetivos Particulares

- Definir la distribución de la proteína nucleolar - Fibrilarina - en cada etapa de la profase meiótica I.
- Definir la distribución de la proteína nucleolar - Nucleolina - en cada etapa de la profase meiótica I.
- Definir la distribución de la proteína nucleolar - Nucleofosmina - en cada etapa de la profase meiótica I.
- Relacionar la distribución de las proteínas nucleolares durante la profase meiótica I.

Material y Métodos

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos se utilizaron testículos de 6 ratas adultas de la cepa Wistar para todos los experimentos. La manipulación de los animales se realizó siguiendo los lineamientos éticos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (SAGARPA, 2015).

1. Obtención del material biológico

Se obtuvieron los testículos de 6 ratas adultas y se procesaron para técnicas histológicas y para técnicas citogenéticas a nivel de microscopía óptica.

2. Procesamiento del material biológico para técnicas histológicas

2.1. Fijación e inclusión

Las ratas fueron anestesiadas con éter, para extraer los testículos, los cuales se cortaron transversalmente en tres porciones. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C y en el fijador Histochoice (Amresco No Cat H120) por 24 horas. Después de este tiempo las muestras se lavaron por 1 hora en PBS y se deshidrataron en alcoholes graduales a partir de etanol al 30% hasta etanol absoluto. Las muestras se aclararon en etanol absoluto-xilol, seguido de aceite de cedro-xilol [1:1] y finalmente xilol, se continuó con la infiltración de las muestras con parafina-xilol y dos cambios de parafina pura a 60°C para incluirlos en bloques de parafina.

2.2. Cortes con Micrótopo

Se obtuvieron cortes de 5-7 μm de espesor en un micrótopo de rotación marca LEICA modelo RM3125. Los cortes se montaron en portaobjetos preparados con Poli-L-lisina.

3. Procesamiento del material biológico para técnicas citogenéticas

Para las dispersiones (spreading) de células de los túbulos seminíferos, los testículos fueron colocados en PBS pH 7 a temperatura ambiente sin túnica albugínea. El testículo fue seccionado en fragmentos pequeños de aproximadamente 5mm³ y se colocaron en amortiguador hipotónico durante 60 minutos, posteriormente las muestras se colocaron en 20 μl de solución de sacarosa 100 mM a pH 8.2.

El tejido se disgregó con ayuda de unas pinzas. La solución obtenida de la disgregación se resuspendió con 40 µl de sacarosa 100 mM pH 8.2 y se dispersó sobre un portaobjetos sumergido previamente en paraformaldehído al 1% con Tritón X100. Las preparaciones se dejan secar y se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

4. Tinciones aplicadas a las técnicas histológicas y citogenéticas

Los cortes de parafina de 5-7 µm se desparafinaron e hidrataron para continuar con la tinción y así evaluar los estadios de la profase meiótica 1.

4.1. Tinción de Impregnación argéntica para región organizadora del nucléolo (AgNOR)

A los cortes de testículo y a las dispersiones se les aplicó la técnica de AgNOR (**Plotón et al., 1987**) utilizando nitrato de plata (J.T. Baker, Lot T49C05) al 50% y agua destilada en una proporción 1:2 añadiendo 50% del volumen final de solución de gelatina con ácido fórmico.

5. Anticuerpos para cortes

Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína nucleolar Fibrilarina a una dilución 1:50. Para las proteínas nucleolares Nucleolina y Nucleofosmina se usó un anticuerpo policlonal de conejo a una dilución 1:100 y 1:1000. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados con fluoresceína (FITC) y con rojo Texas (RT) a una dilución 1:200.

6. Anticuerpos para dispersiones

Para localizar la proteína del complejo sinaptonémico 3 (SCP3) se usó el anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo monoclonal de ratón en las diluciones de 1:400 y 1:100 respectivamente. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína nucleolar Fibrilarina a una dilución 1:50. Para las proteínas nucleolares Nucleolina y Nucleofosmina se usó un anticuerpo policlonal de conejo a una dilución 1:100 y 1:1000. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados con fluoresceína (FITC) y con rojo Texas (RT) a una dilución 1:200.

7. Observación de las muestras

Una vez concluido lo anterior, se procedió a la observación de las preparaciones en los cortes de parafina. Para obtener las células de cada una de las etapas de la profase meiótica se compararon los cortes con las descripciones clásicas del ciclo espermatogénico de la rata (**Leblond y Clermont, 1952**). Una vez localizado cada uno de los tipos celulares de acuerdo a las asociaciones celulares del epitelio seminífero se procedió a la adquisición de imágenes de células germinales como espermatogonias tipo A y tipo B y los espermatocitos en las fases de preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno temprano, paquiteno medio, paquiteno tardío y diploteno, así como de las células de Sertoli. Las imágenes se adquirieron en un microscopio de epifluorescencia Nikon modelo Eclipse E600 con cámara Digital DXM1200F. Para determinar la etapa de las células germinales en las dispersiones se realizó una comparación de acuerdo a la clasificación de Anna Kuztnetsova (2004 comunicación personal).

8. Cuantificación celular

Se cuantificaron las células de la profase meiótica I con la técnica de impregnación argéntica AgNOR, con ello se contaron los organizadores nucleolares en las distintas células de los estadios de la profase meiótica I. En total se contaron 927 células: 149 células de Sertoli, 82 células de espermatocito primario en preleptoteno, 89 células de espermatocito primario en leptoteno, 102 células de espermatocito primario en cigoteno, 87 células de espermatocito primario en paquiteno temprano, 127 células de espermatocito primario en paquiteno medio, 173 células de espermatocito primario en paquiteno tardío y 118 células de espermatocito primario en diploteno. Con dichos valores se realizó la prueba estadística ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey en el software GraphPad Prism 6.

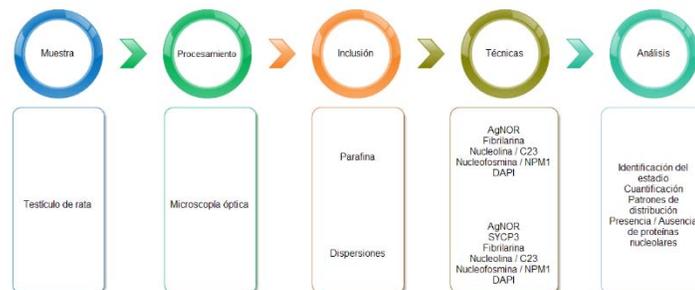


Figura 15. Diagrama del modelo de trabajo desde la obtención de la muestra hasta el análisis de resultados.

Resultados

I. Impregnación Argéntica

Mediante la técnica de impregnación argéntica (AgNOR) que se realizó en dispersiones (material nuclear completo) y en los cortes de parafina evidenció las regiones organizadoras del nucleólo (NOR) impregnados y su distribución. Las células de Sertoli presentes en el epitelio seminífero se emplearon como control de la impregnación debido a que son unas células somáticas con un único nucleólo con organización tripartita y por lo tanto con organizadores nucleolares bien definidos. La impregnación del AgNOR mostró que la célula de Sertoli presenta un cúmulo impregnado central y en ocasiones en la periferia de su núcleo (Figura 16-A), por otro lado en los núcleos de las espermatogonias tipo A y B se identificaron varios cúmulos con una distribución aleatoria (Figura 16-B y C), mientras que en los núcleos de células de espermatoцитos primarios en preleptoteno (Figura 16-D) y leptoteno (Figura 16-E) se observaron en promedio 3 a 4 cúmulos con una distribución periférica; en los cigoteno (Figura 16-F) se encontraron en promedio 2 a 3 cúmulos con distribución periférica. Las células en paquiteno temprano (Figura 16-G) y paquiteno medio (Figura 16-H) mostraron en promedio 3 cúmulos impregnados con una mayor distribución hacia la periferia, en cuanto a los espermatoцитos en paquiteno tardío (Figura 16-I) se identificaron en promedio 2 cúmulos hacia la periferia, y finalmente, en los núcleos de espermatoцитos en diploteno (Figura 16-J) se observó en promedio 1 a 2 cúmulos con una distribución aleatoria.

En cuanto a las dispersiones (spreads) de las células espermáticas se corroboró la distribución de los cúmulos o fragmentos nucleolares en el material nuclear observados en los cortes de parafina. Las células en profase meiótica se reconocieron y diferenciaron de otros tipos celulares presentes en las dispersiones por la organización y arreglo de los ejes cromosómicos. En las células de Sertoli se observó que el nucleólo se muestra como un cúmulo que tiene una localización central en el núcleo (Figura 17-A), mientras que en los espermatoцитos primarios en leptoteno (Figura 17-B) se exhiben cúmulos que tienen una distribución aleatoria en el material nuclear. En cuanto a los espermatoцитos en cigoteno, paquiteno temprano, paquiteno medio y paquiteno tardío se presentan cúmulos con una distribución preferencial hacia la periferia del material nuclear (Figura 17-C, D, E y F) y finalmente, los espermatoцитos en diploteno mostraron que los cúmulos tienen una distribución central dentro del núcleo (Figura 17-G).

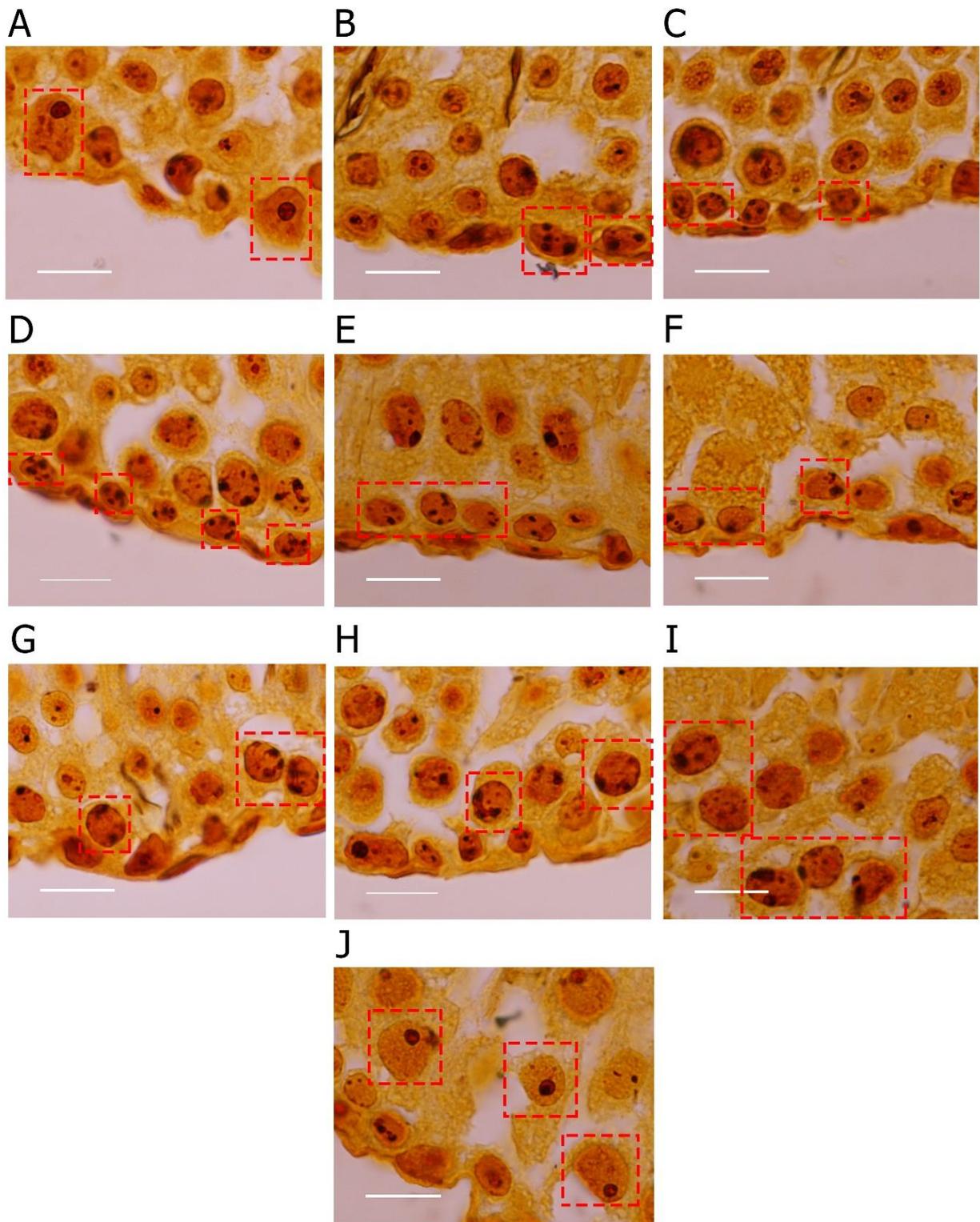


Figura 16. Corte transversal de túbulo seminífero donde las células de interés se enmarcan en el recuadro rojo. A) Célula de Sertoli. B) Espermatogonia Tipo A. C) Espermatogonia Tipo B. D) Espermatocito primario en fase de Preleptoteno. E) Espermatocito primario en fase de Leptoteno. F) Espermatocito primario en fase de Cigoteno. G) Espermatocito primario en fase de Paquiteno temprano. H) Espermatocito primario en fase de Paquiteno medio. I) Espermatocito primario en fase de Paquiteno tardío. J) Espermatocito primario en fase de Diploteno. Método de Impregnación Argéntica. Barra 10 μ m.

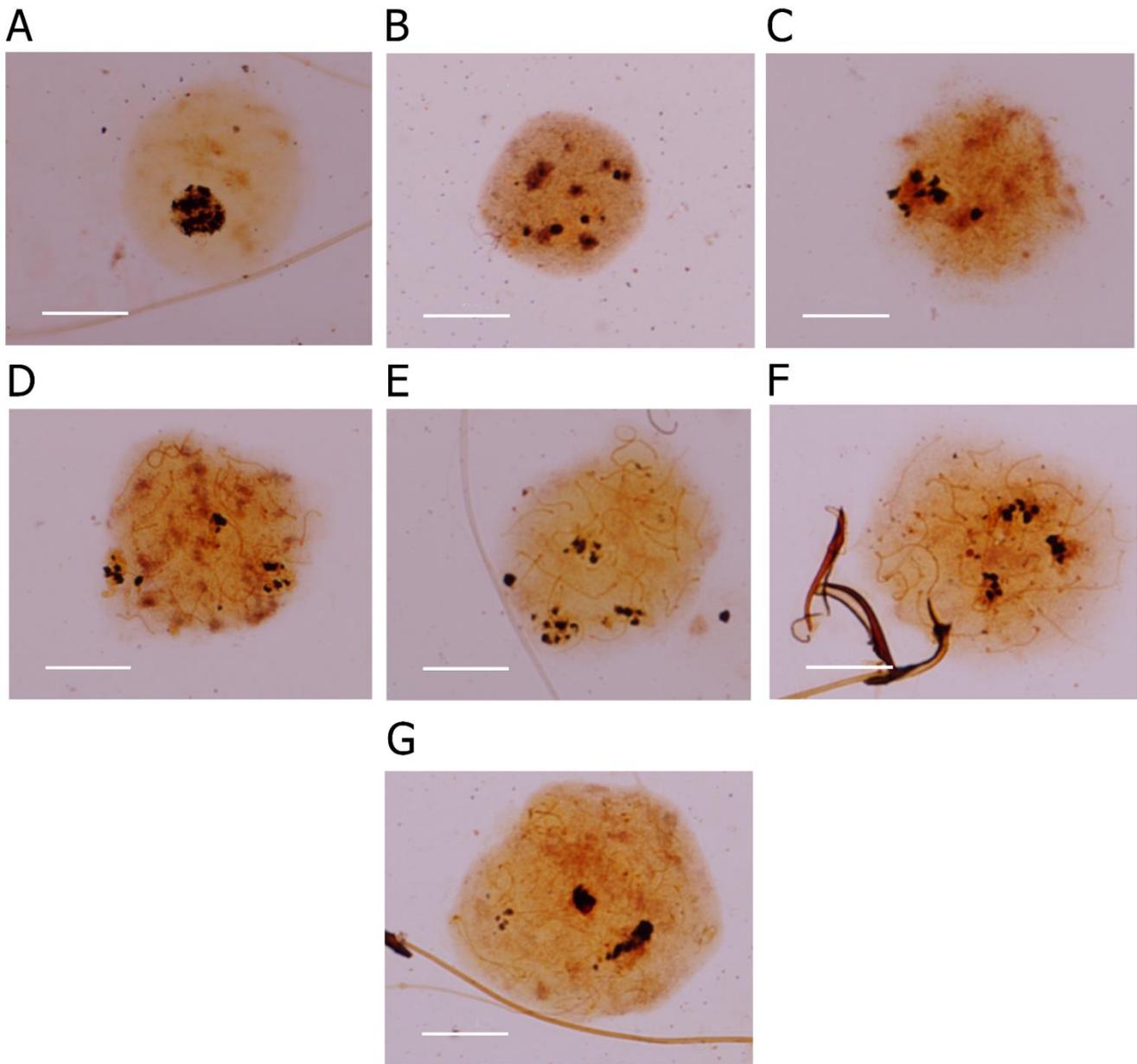


Figura 17. Dispersiones de células de túbulo seminífero. A) Núcleo de célula de Sertoli. B) Núcleo de espermatocito primario en fase de Leptoteno. C) Núcleo de espermatocito primario en fase de Cigoteno. D) Núcleo de espermatocito primario en fase de Paquiteno temprano. E) Núcleo de espermatocito primario en fase de Paquiteno medio. F) Núcleo de espermatocito primario en fase de Paquiteno tardío. G) Núcleo de espermatocito primario en fase de Diploteno. Tinción Impregnación Argéntica. Barra 10 μ m

La técnica de impregnación argéntica evidenció que en los espermatocitos primarios en sus diferentes estadios existen diferencias en la distribución y número de los fragmentos nucleolares presentes.

II. Cuantificación celular (AgNOR)

Mediante la técnica de AgNOR se realizó un conteo de las impregnaciones (Figura 18 y 19) y se observó una diferencia significativa entre el número de fragmentos nucleolares del leptoteno al cigoteno y entre el paquiteno al diploteno. Siendo las células en leptoteno quienes presentan un mayor número de fragmentos nucleolares, mientras que las células en cigoteno presentan en promedio 2 a 3 fragmentos (Figura 18).

Organizadores nucleolares por célula en la Profase meiótica I

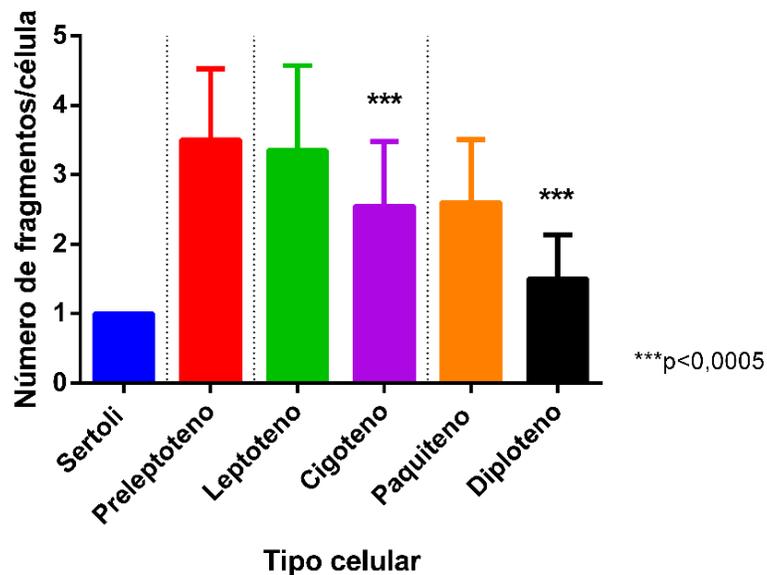


Figura 18. Promedio del número de fragmentos nucleolares en cada tipo celular de la profase meiótica I. Se agruparon los espermatozoides primarios en paquiteno sin hacer distinción entre temprano, medios y tardíos (** $p < 0.0005$).

Con el fin de confirmar la diferencia significativa presente entre las células de paquiteno y diploteno, se diferenciaron las fases del paquiteno en temprano, medio y tardío, lo que evidenció que dicha diferencia significativa sigue presente entre paquiteno tardío-diploteno. Siendo las células en paquiteno tardío donde se observó mayor fragmentación con respecto al diploteno que muestra solo un fragmento y ocasionalmente 2 (Figura 19).

Organizadores nucleolares por célula en la Profase meiótica I

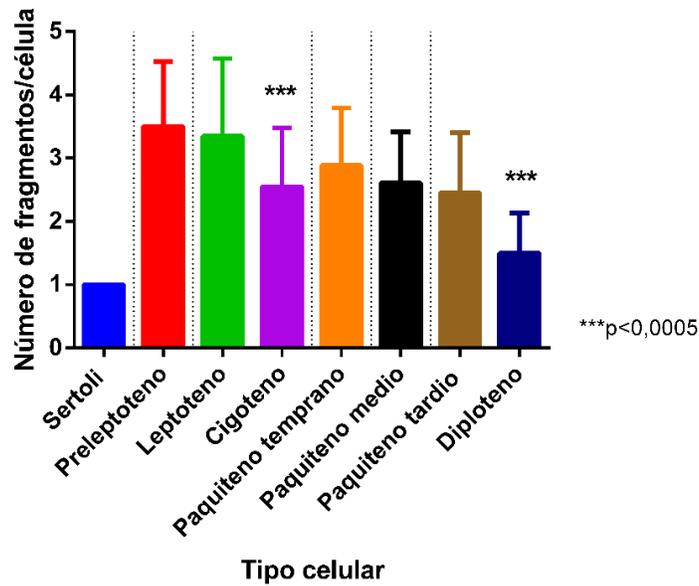


Figura 19. Promedio del número de fragmentos nucleolares en cada tipo celular de la profase meiótica I, señalando a los espermatozoides en paquiteno en etapas de tempranos, medios y tardíos ($***p < 0.0005$).

Dicho lo anterior, los cúmulos positivos a AgNOR encontrados en cada etapa celular fueron diversas, en donde las 149 células de Sertoli presentaron solamente impregnado un solo cúmulo; los espermatozoides en etapa de preleptoteno mostraron gran variabilidad presentando 2 a 6 cúmulos; asimismo las células en leptoteno, cigoteno y paquiteno tardío evidenciaron 1 a 6 cúmulos; por otra parte, las células en paquiteno temprano exhibieron 1 a 5 cúmulos; por otro lado las células en paquiteno medio se observaron 1 a 4 cúmulos y finalmente las células en diploteno mostraron 1 a 3 cúmulos (Tabla 4).

Tabla 4. Número de cúmulos de AgNOR por célula de acuerdo a la etapa de la profase meiótica I.

Tipo celular	Número de marcas de AgNOR por núcleo						Total de células por etapa
	1	2	3	4	5	6	
Célula de Sertoli	149						149
Preleptoteno		14	28	28	9	3	82
Leptoteno	2	25	23	22	13	4	89
Cigoteno	11	39	41	8	2	1	102
Paquiteno temprano	4	26	36	18	3		87
Paquiteno medio	8	52	49	18			127
Paquiteno tardío	26	67	59	18	2	1	173
Diploteno	68	41	9				118

En los diferentes tipos celulares durante la profase meiótica I es posible encontrar una variedad en cuanto al número de fragmentos nucleolares en cada una de las células, sin embargo, es posible identificar una tendencia hacia la reducción conforme transita la profase meiótica I, hasta consolidarse en 1 o 2 nucléolos en las células en diploteno.

III. Inmunodetecciones

La técnica de inmunodetección doble permitió identificar dos proteínas específicas del nucléolo, Fibrilarina y Nucleolina (C23), la Fibrilarina es un elemento del centro fibrilar (CF) y la Nucleolina es un elemento del componente fibrilar denso (CFD).

En estos ensayos la célula de Sertoli se utilizó como control positivo, debido a que muestra un nucléolo con sus componentes bien definidos (Figura 20-1). La doble inmunolocalización mostró que la célula de Sertoli tiene un nucléolo en el que la fibrilarina y la nucleolina colocalizan como una sola unidad dentro del núcleo. En los núcleos de células de espermatoцитos primarios en preleptoteno y leptoteno (Figura 20-2 y 3) se observaron varios cúmulos marcados para Fibrilarina y C23 que en ocasiones colocalizaron en diferentes zonas de sus núcleos.

En cigoteno, paquiteno temprano y paquiteno medio (Figura 21-1,2 y 3) vimos varios cúmulos marcados para Fibrilarina y C23, que en ocasiones colocalizan en diferentes regiones de sus núcleos.

En paquiteno tardío y diploteno (Figura 22-1 y 2) se observó que existen varios cúmulos marcados para Fibrilarina y C23, estas marcas en ocasiones colocalizaron en diferentes zonas nucleares; en todas las etapas de la profase meiótica I se mantuvo de manera frecuente una distribución de cúmulos preferencialmente hacia la periferia cercanos a la envoltura nuclear.

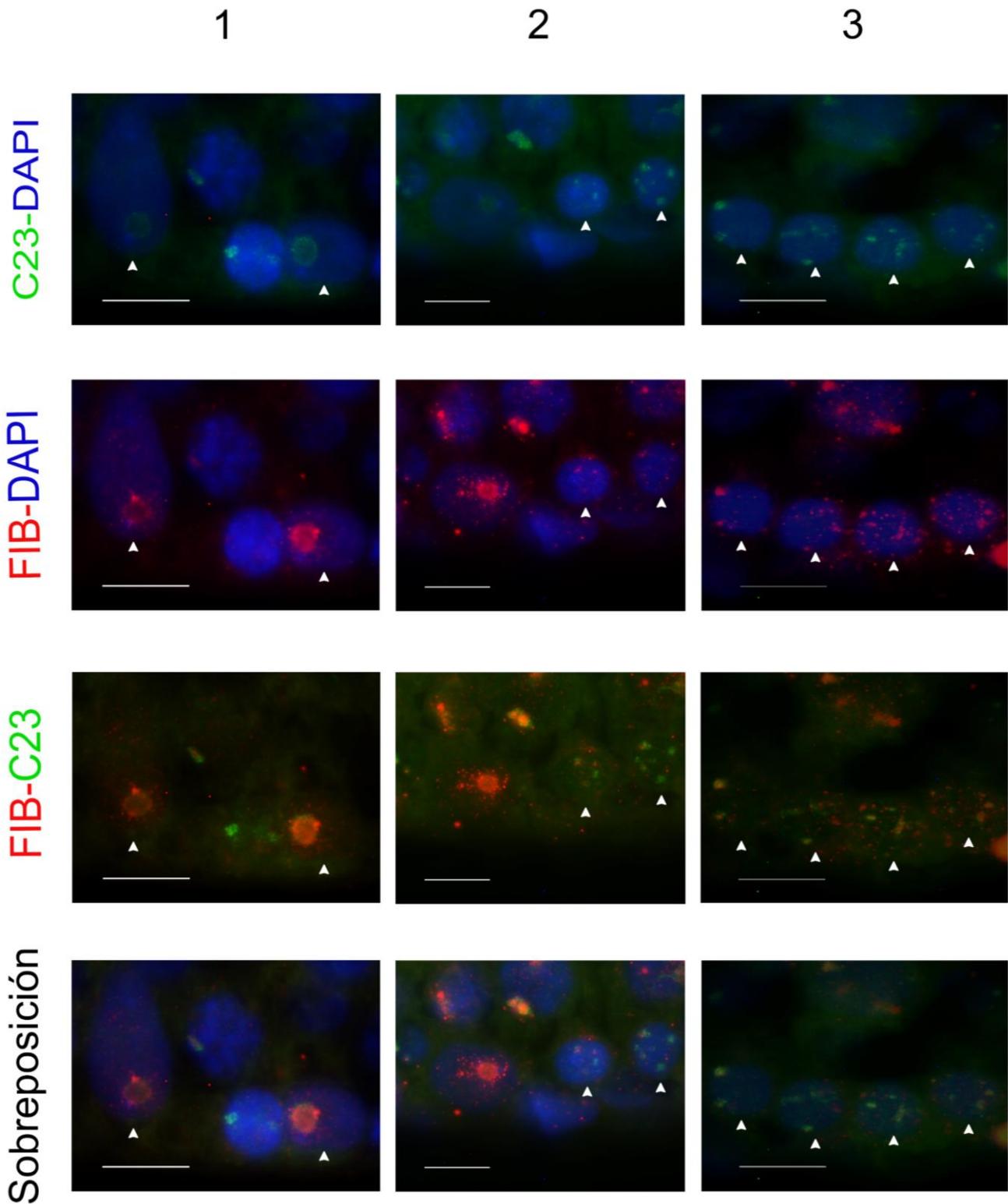


Figura 20. Corte transversal de túbulo seminífero donde los tipos celulares son señalados con cabezas de flecha. 1) Célula de Sertoli. 2) Espermatocito primario en fase de Preleptoteno. 3) Espermatocito primario en fase de Leptoteno. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y Nucleolina con DAPI. Barra 10 μ m

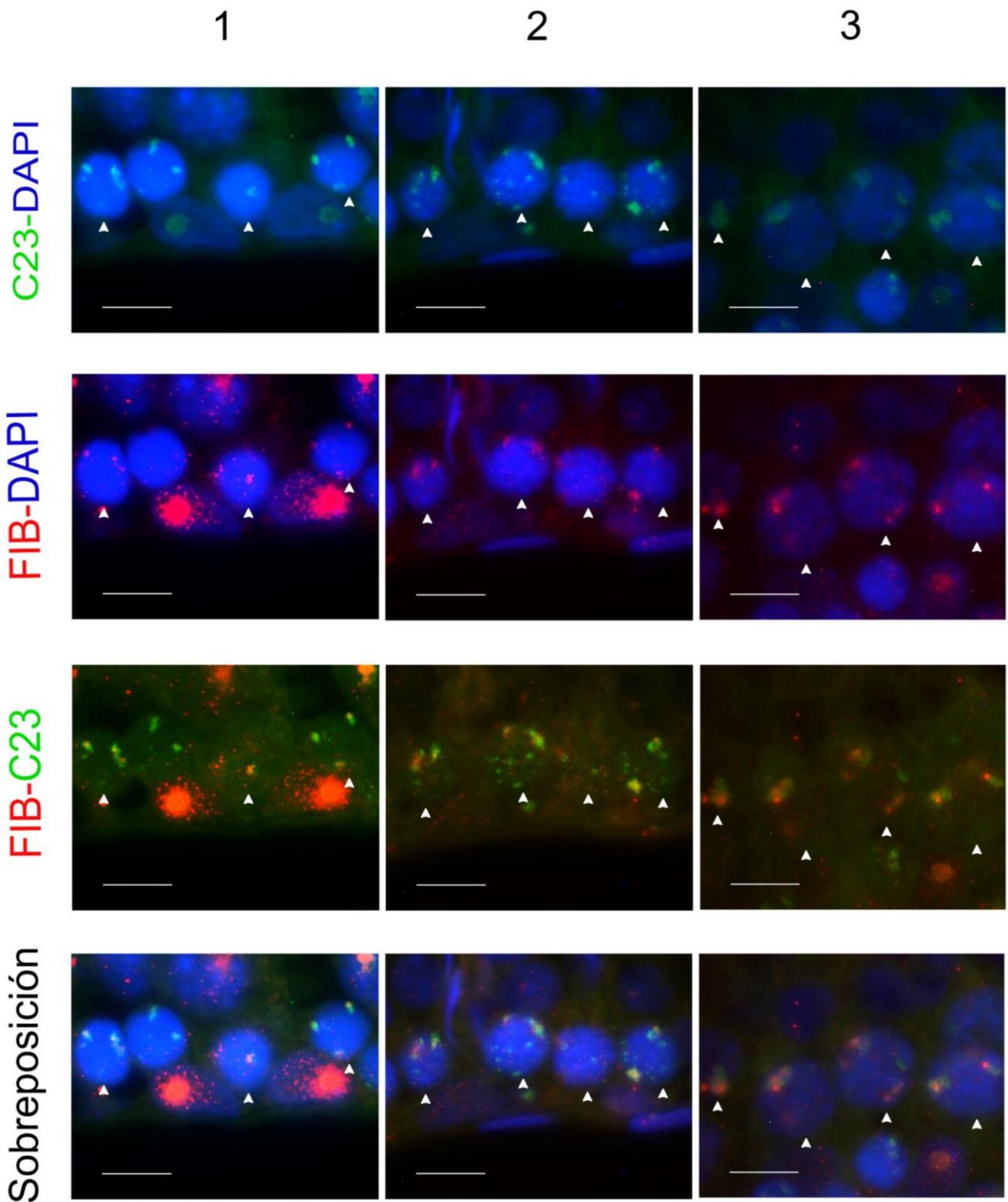


Figura 21. Corte transversal de túbulo seminífero donde las células en profase meiótica son señaladas con cabezas de flecha. 1) Espermatozoides primarios en fase de Cigoteno. 2) Espermatozoides primarios en fase de Paquíteno Temprano. 3) Espermatozoides primarios en fase de Paquíteno Medio. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y Nucleolina con DAPI. Barra 10 μ m.

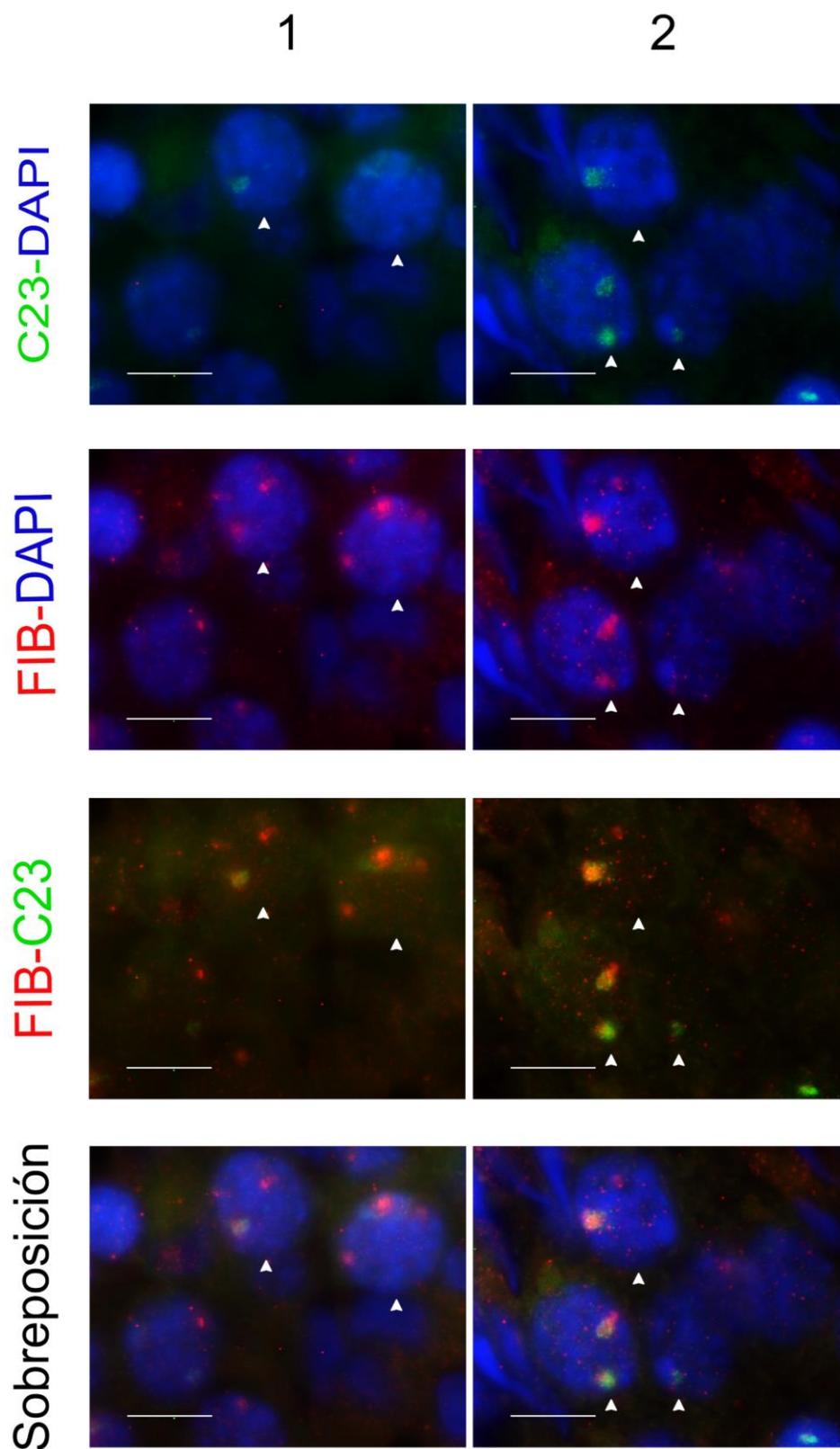


Figura 22. Corte transversal de túbulo seminífero donde se señalan las células en profase meiótica con cabezas de flecha. 1) Espermatozoides primarios en fase de Paquíteno Tardío. 2) Espermatozoides primarios en fase de Diploteno. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y Nucleolina con DAPI. Barra 10 μ m.

De igual modo se realizaron ensayos de inmunodetecciones dobles para localizar a las proteínas Fibrilarina y Nucleofosmina (NPM1), donde la Nucleofosmina marca el componente granular (CG).

En estos ensayos las células de Sertoli se utilizaron como control positivo, debido a que muestra un nucléolo con sus componentes bien definidos (Figura 23-1). La doble inmunolocalización mostró que la célula de Sertoli tiene un nucléolo en el que la fibrilarina y la nucleofosmina colocalizan como una sola unidad dentro del núcleo. Los núcleos de células de espermatocitos primarios en preleptoteno y leptoteno (Figura 23-2 y 3) evidenciaron varios cúmulos marcados para Fibrilarina y NPM1, que en ocasiones colocalizaron en diferentes zonas de sus núcleos.

En cigoteno, paquiteno temprano y paquiteno medio (Figura 24-1,2 y 3) los espermatocitos presentaron varios cúmulos marcados para Fibrilarina y NPM1, que en ocasiones colocalizan en diferentes regiones nucleares.

En paquiteno tardío y diploteno (Figura 25-1 y 2) se observó que existen varios cúmulos marcados para Fibrilarina y NPM1, estas marcas en ocasiones colocalizaron en diferentes zonas nucleares; en todas las etapas de la profase meiótica I se mantuvo de manera frecuente una distribución preferencial hacia la periferia cercana a la envoltura nuclear.

En ambos ensayos presentaron el mismo comportamiento de las proteínas Fibrilarina-Nucleolina y Fibrilarina-Nucleofosmina en las diferentes células durante la profase meiótica I, es decir se identificaron varias marcas para ambos ensayos y las marcas en ocasiones colocalizaron en diferentes zonas con una distribución preferencial hacia la periferia nuclear.

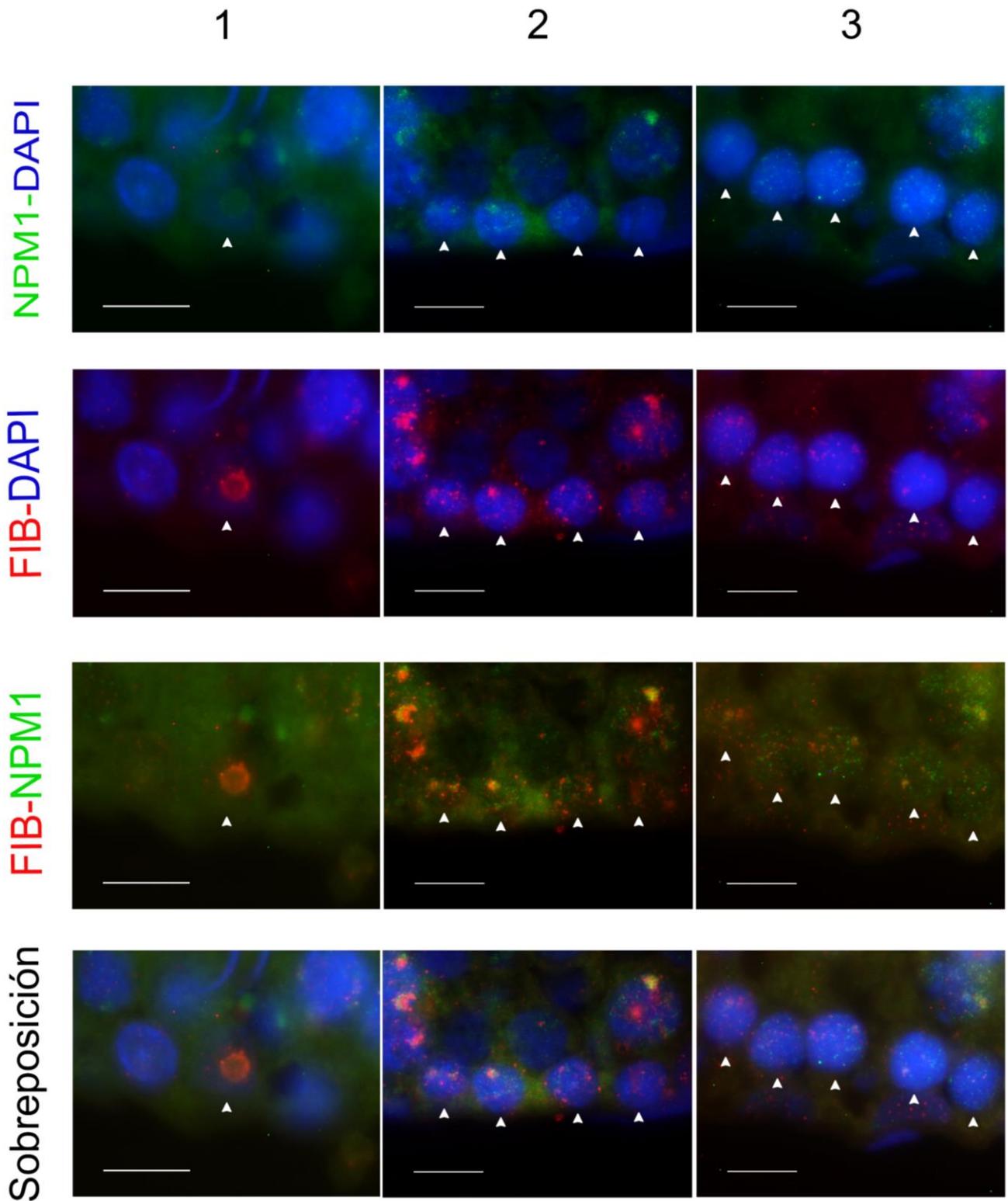


Figura 23. Corte transversal de túbulo seminífero donde las células en profase meiótica son señaladas con cabezas de flecha. 1) Célula de Sertoli. 2) Espermatocito primario en fase de Preleptoteno. 3) Espermatocito primario en fase de Leptoteno. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y Nucleofosmina con DAPI. Barra 10 μ m

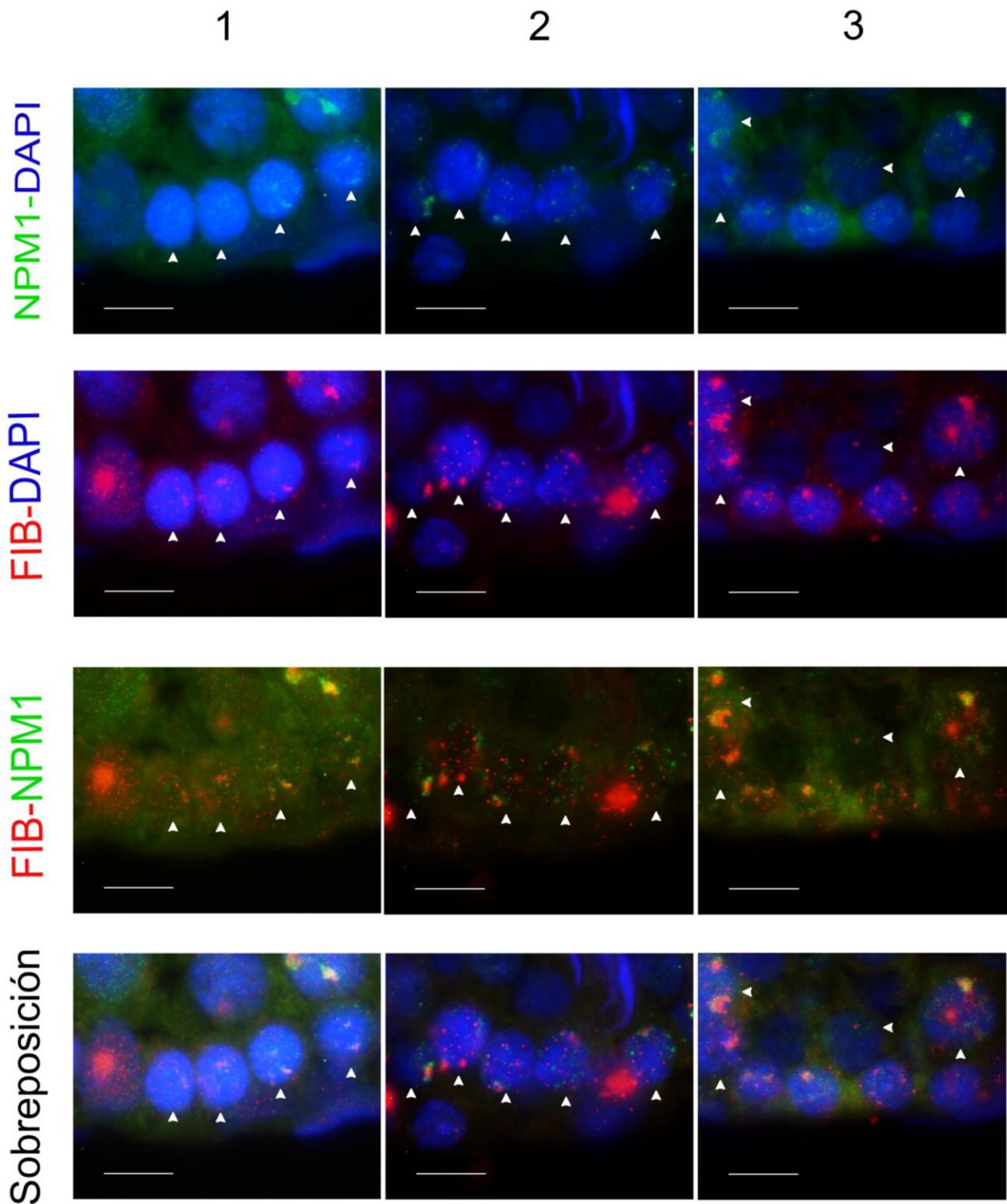


Figura 24. Corte transversal de túbulo seminífero donde las células en profase meiótica son señaladas con cabezas de flecha. 1) Espermatocito primario en fase de Cigoteno. 2) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Temprano. 3) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Medio. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y Nucleofosmina con DAPI. Barra 10 μ m.

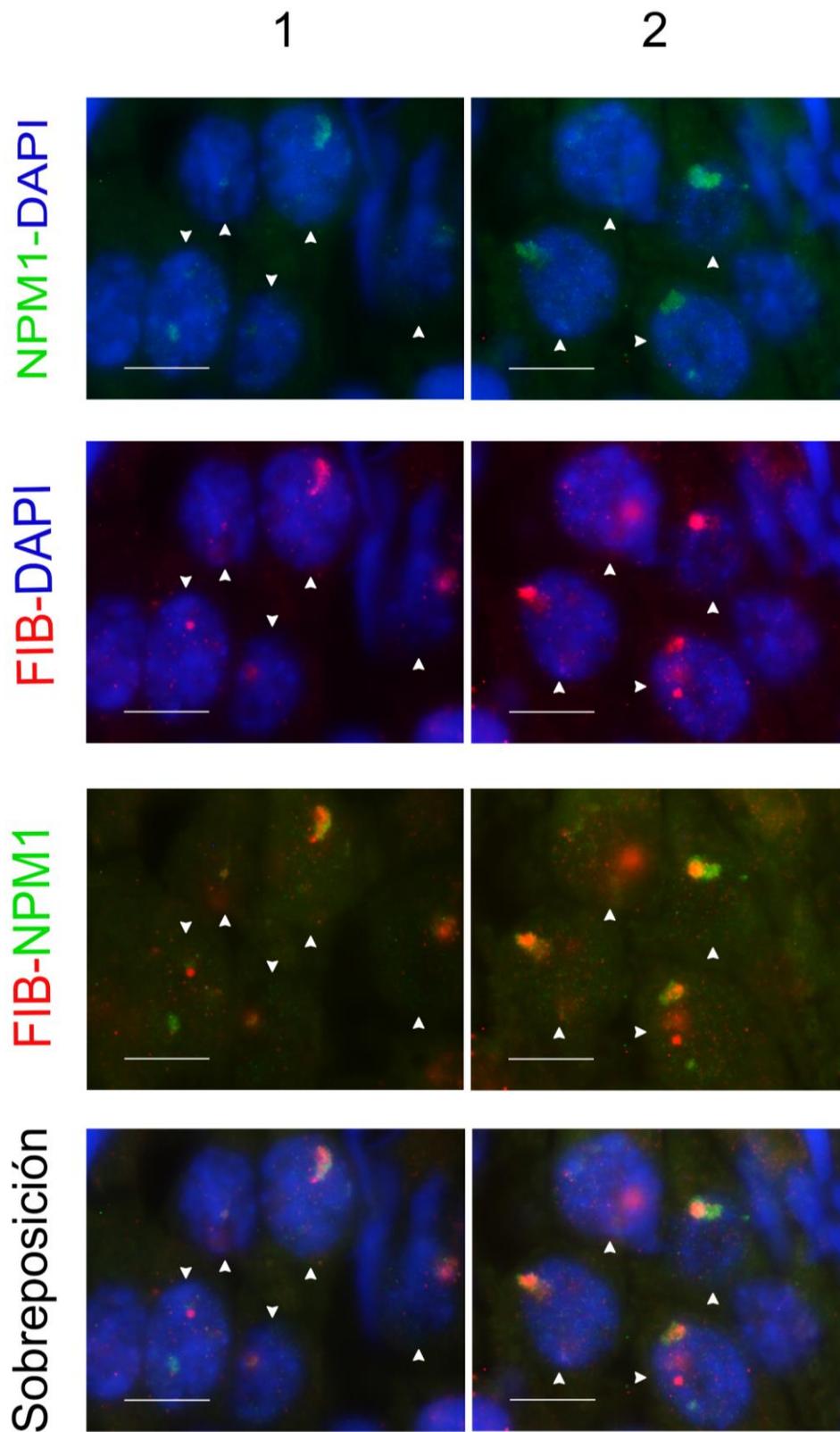


Figura 25. Corte transversal de túbulo seminífero donde las células en profase meiótica son señaladas con cabezas de flecha. 1) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Tardío. 2) Espermatocito primario en fase de Diploteno. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y Nucleofosmina con DAPI. Barra 10 μ m.

Con respecto a las dispersiones, se realizaron ensayos de inmunodetección doble, con el siguiente esquema: Fibrilarina con SYCP3 para la proteína 3 del complejo sinaptonémico (CS), C23 con SYCP3 y NPM1 con SYCP3. Este diseño se siguió para corroborar la distribución de estas proteínas nucleolares en el material nuclear de los espermatocitos en profase meiótica. Las etapas de la profase meiótica I se reconocieron por la organización y arreglo de la proteína SYCP3.

Las células de Sertoli no presentaron marca de SYCP3 ya que se trata de una proteína específica de la meiosis, no obstante, mostraron una marca positiva para Fibrilarina, C23 y NPM1 (Figura 26-1, 29-1 y 32-1). La marca para las proteínas nucleolares inmunodetectadas en las células de Sertoli mostraron una distribución aleatoria en sus núcleos, a diferencia de lo que sucedió en los espermatocitos primarios donde la señal se observó con distribución periférica y aleatoria. En los espermatocitos en leptoteno (Figura 26-2, 29-2 y 32-2) se visualizó la marca de SYCP3 como finos filamentos, mientras que Fibrilarina, C23 y NPM1 presentaron marcas que se ubican hacia la periferia del núcleo. En la etapa de cigoteno (Figura 26-3, 29-3 y 33-3) se vio marca de SYCP3 en forma de herradura, y las proteínas Fibrilarina, C23 y NPM1 se presentaron hacia la periferia del núcleo.

Por otro lado, en el paquiteno temprano (Figura 27-1, 30-1 y 33-1) se apreció a la proteína SYCP3 como filamentos y las proteínas Fibrilarina, C23 y NPM1 se observaron con una distribución aleatoria en el núcleo. En los espermatocitos en paquiteno medio la proteína SYCP3 (Figura 27-2, 30-2 y 33-2) se apreció en filamentos, para el caso de las proteínas Fibrilarina, C23 y NPM1 la positividad se muestra con una mayor distribución hacia la periferia. En el caso de los paquitenos tardíos (Figura 27-3, 30-3 y 33-3) se observaron filamentos de SYCP3 con extremos en forma de corazón, por otro lado, la Fibrilarina, C23 y NPM1 se presentaron con una distribución preferencial en la periferia del núcleo.

Finalmente en el diploteno (Figura 28-1, 31-1 y 34-1) se apreciaron muchos filamentos de SYCP3 y las proteínas Fibrilarina, C23 y NPM1 mostraron marca positiva con distribución aleatoria.

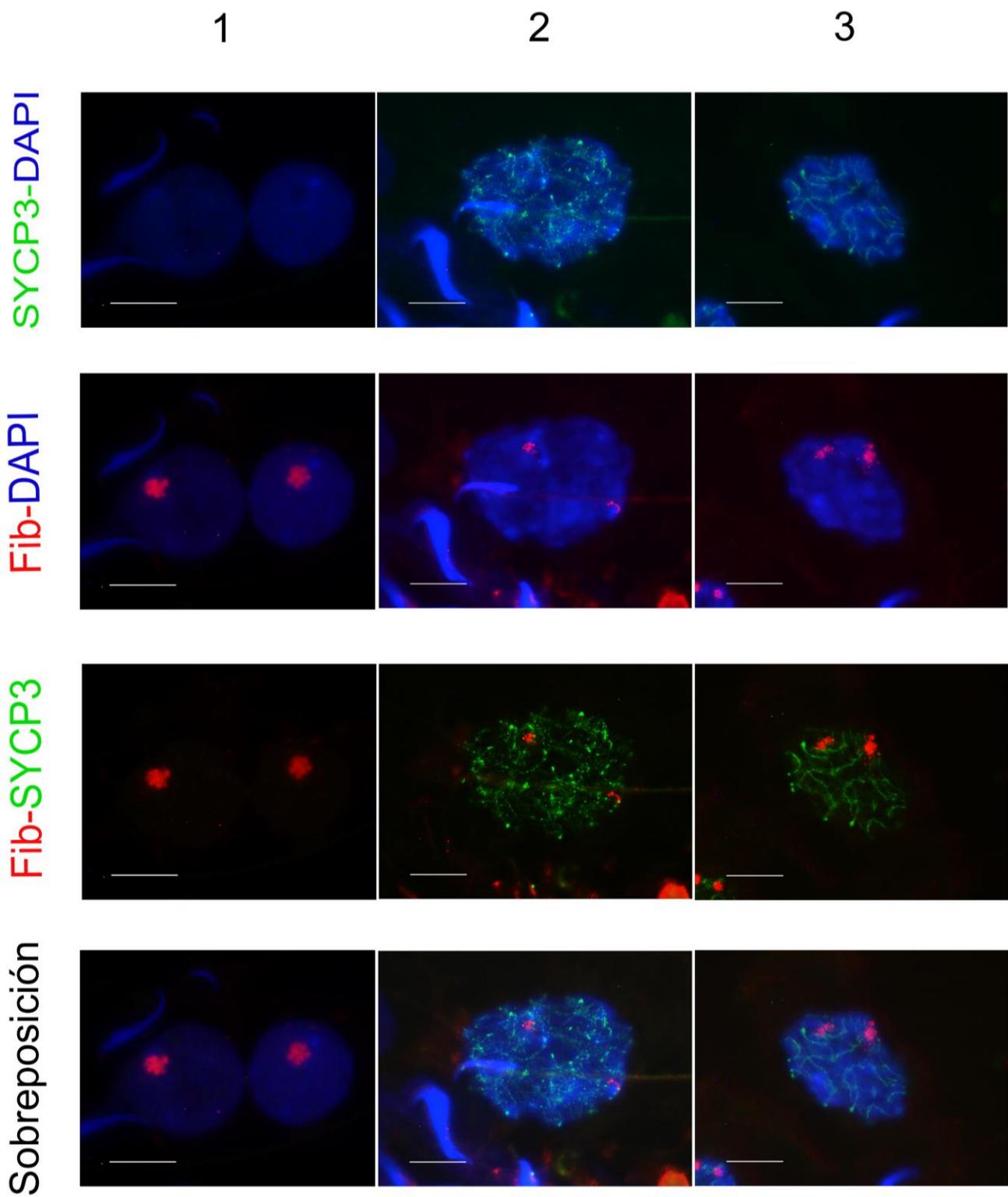


Figura 26. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Célula de Sertoli. 2) Espermatocito primario en fase de Leptonema. 3) Espermatocito primario en fase de Zygotema. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μ m

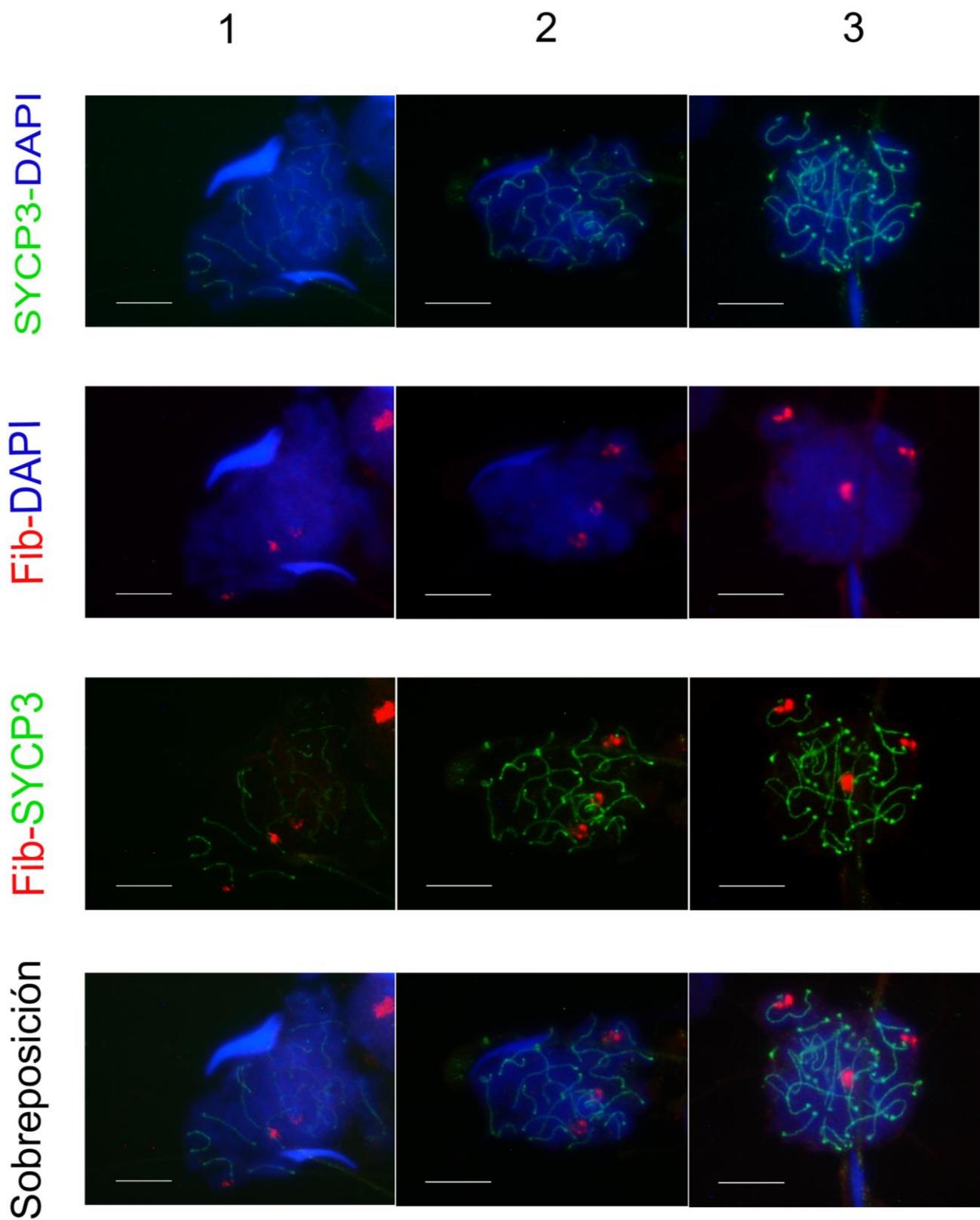


Figura 27. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Temprano. 2) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Medio. 3) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Tardío. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μ m.

1

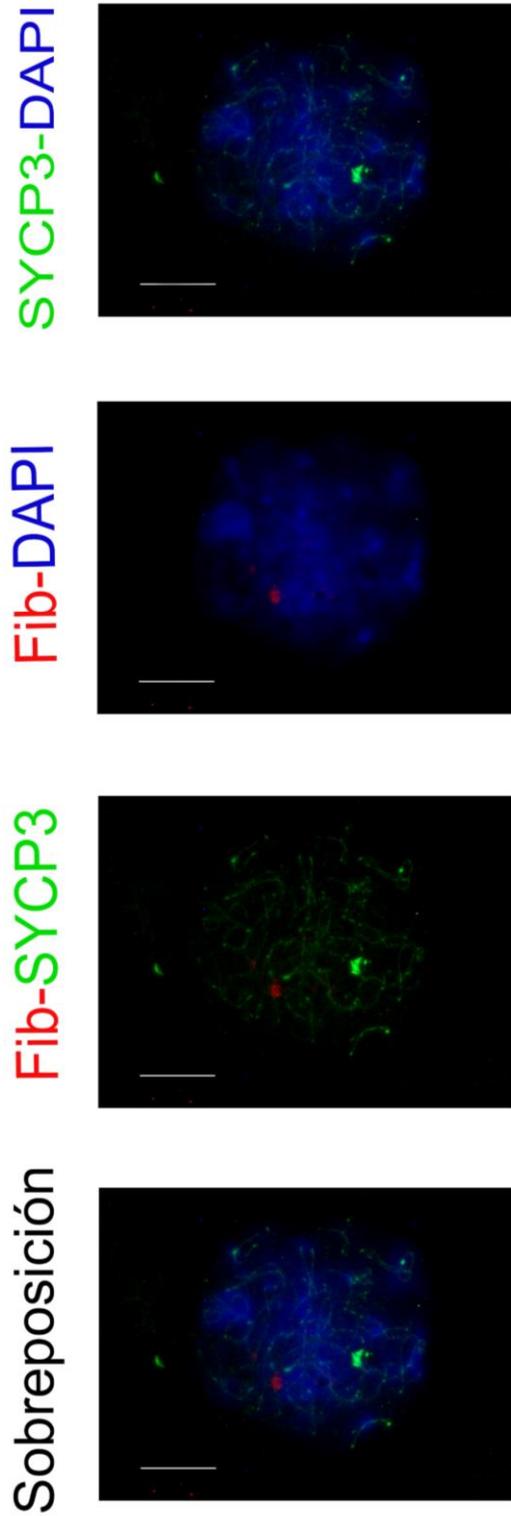


Figura 28. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Espermatocito primario en fase de Diploteno. Inmunodetección de proteínas nucleolares Fibrilarina y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μm.

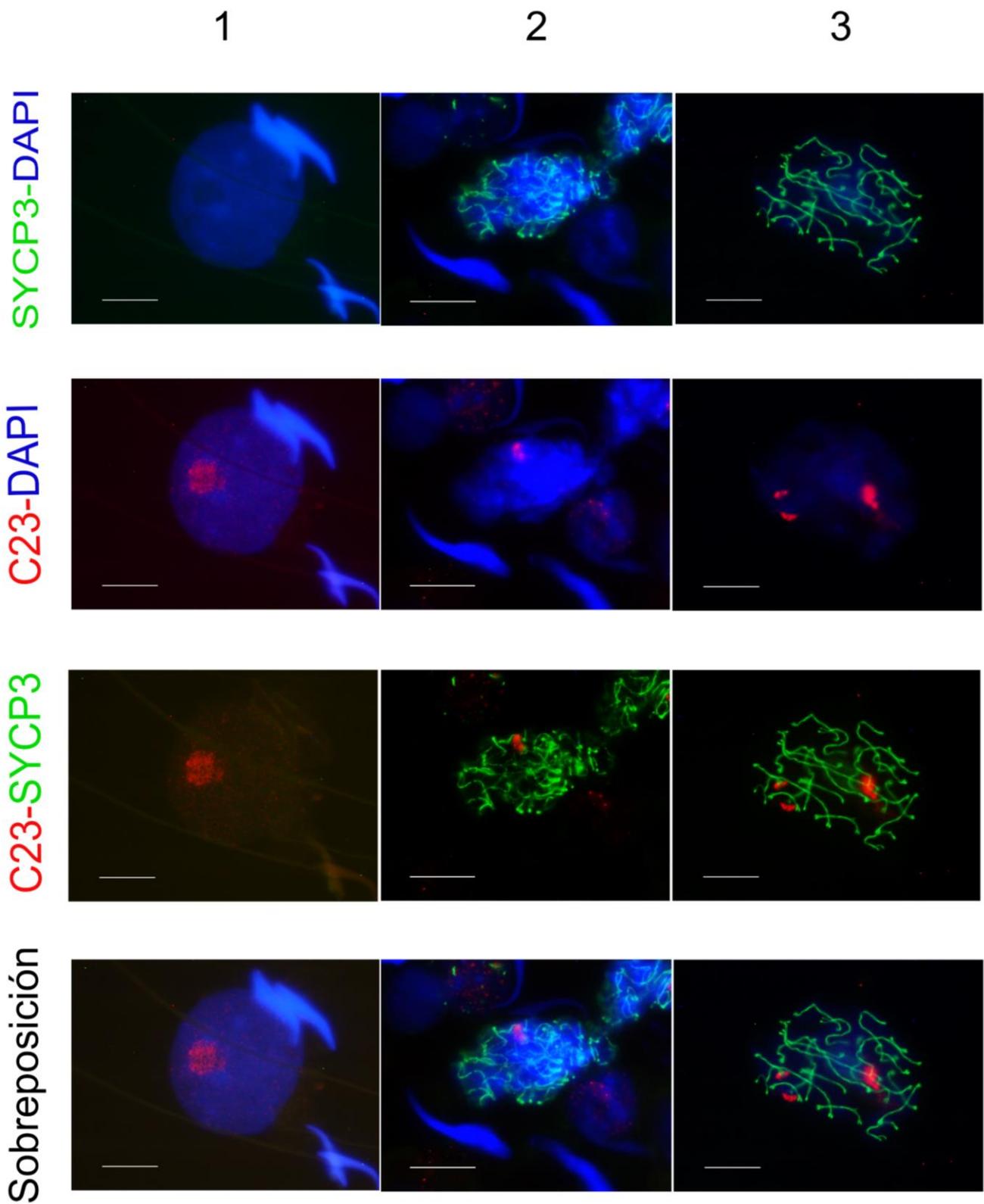


Figura 29. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Célula de Sertoli. 2) Espermatocito primario en fase de Leptonema. 3) Espermatocito primario en fase de Zygonema. Inmunodetección de proteínas nucleolares C23 y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μ m.

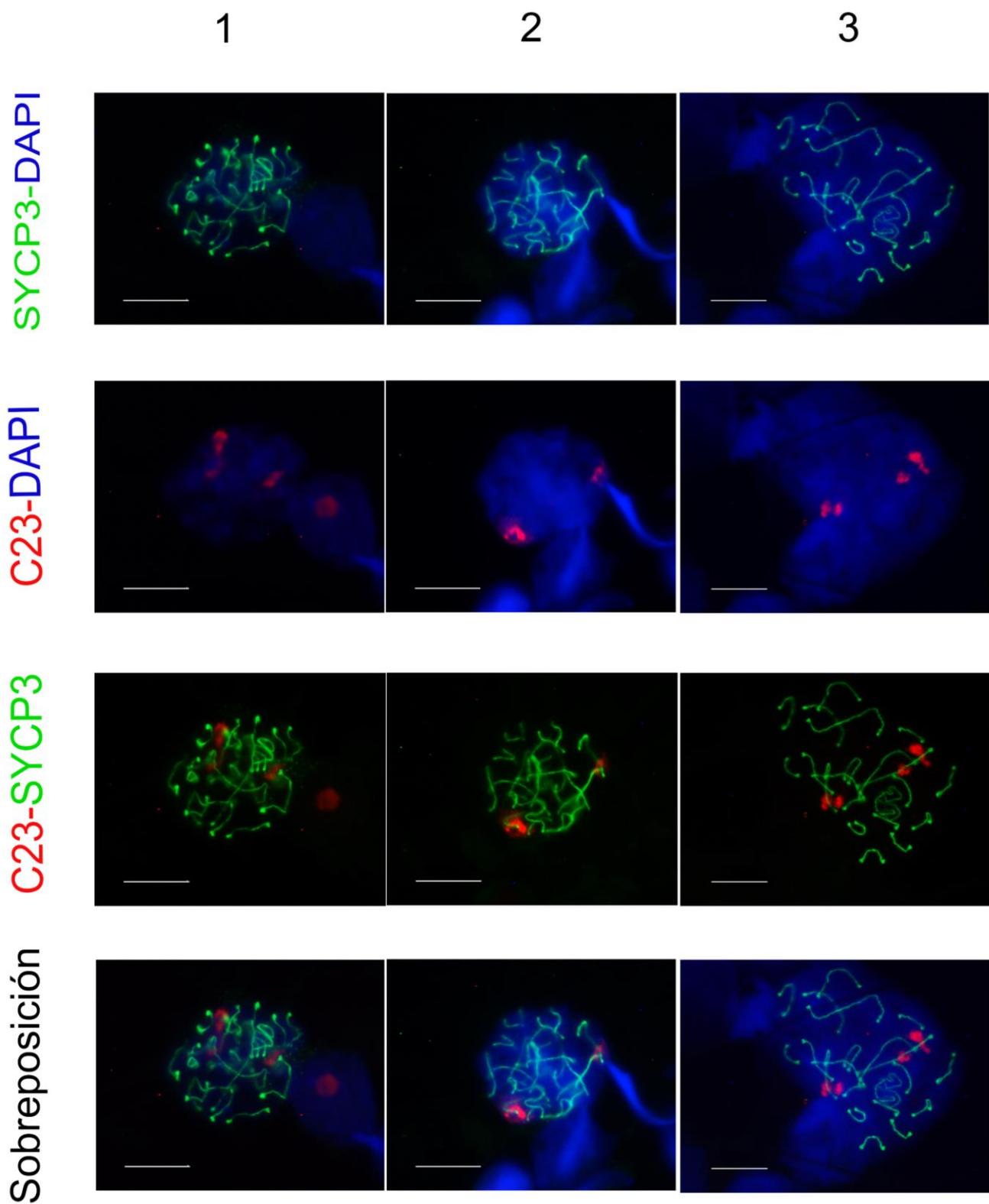


Figura 30. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Temprano. 2) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Medio. 3) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Tardío. Inmunodetección de proteínas nucleolares C23 y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μ m.

1

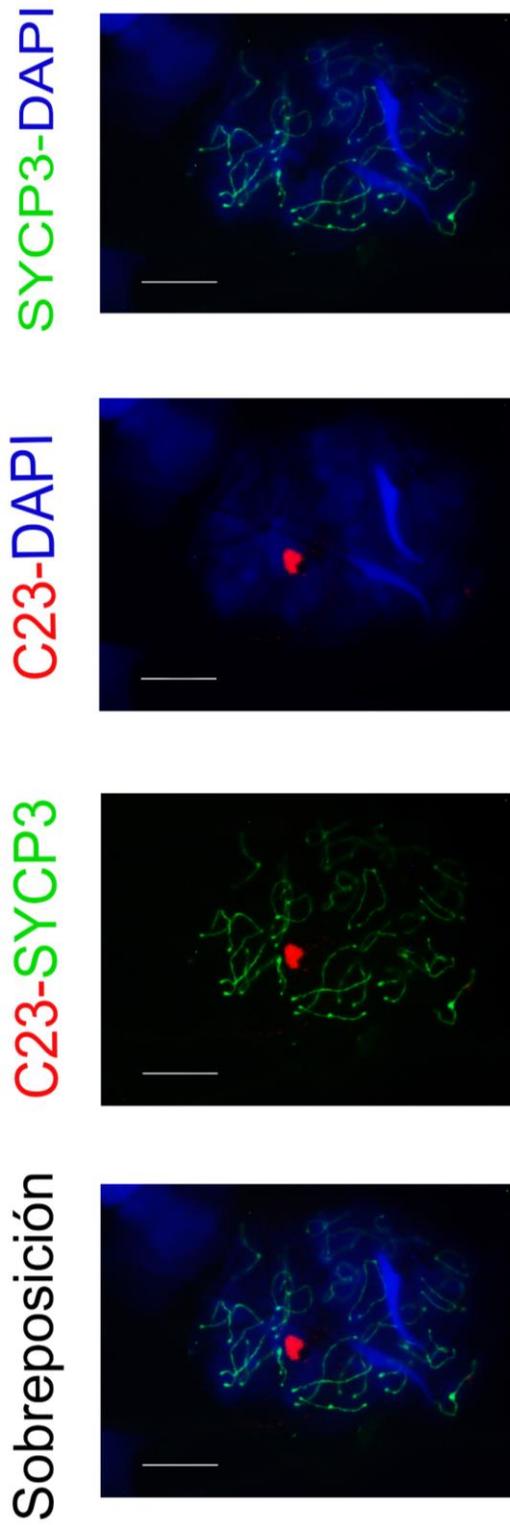


Figura 31. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Espermatocito primario en fase de Diploteno. Inmunodetección de proteínas nucleolares C23 y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μ m.

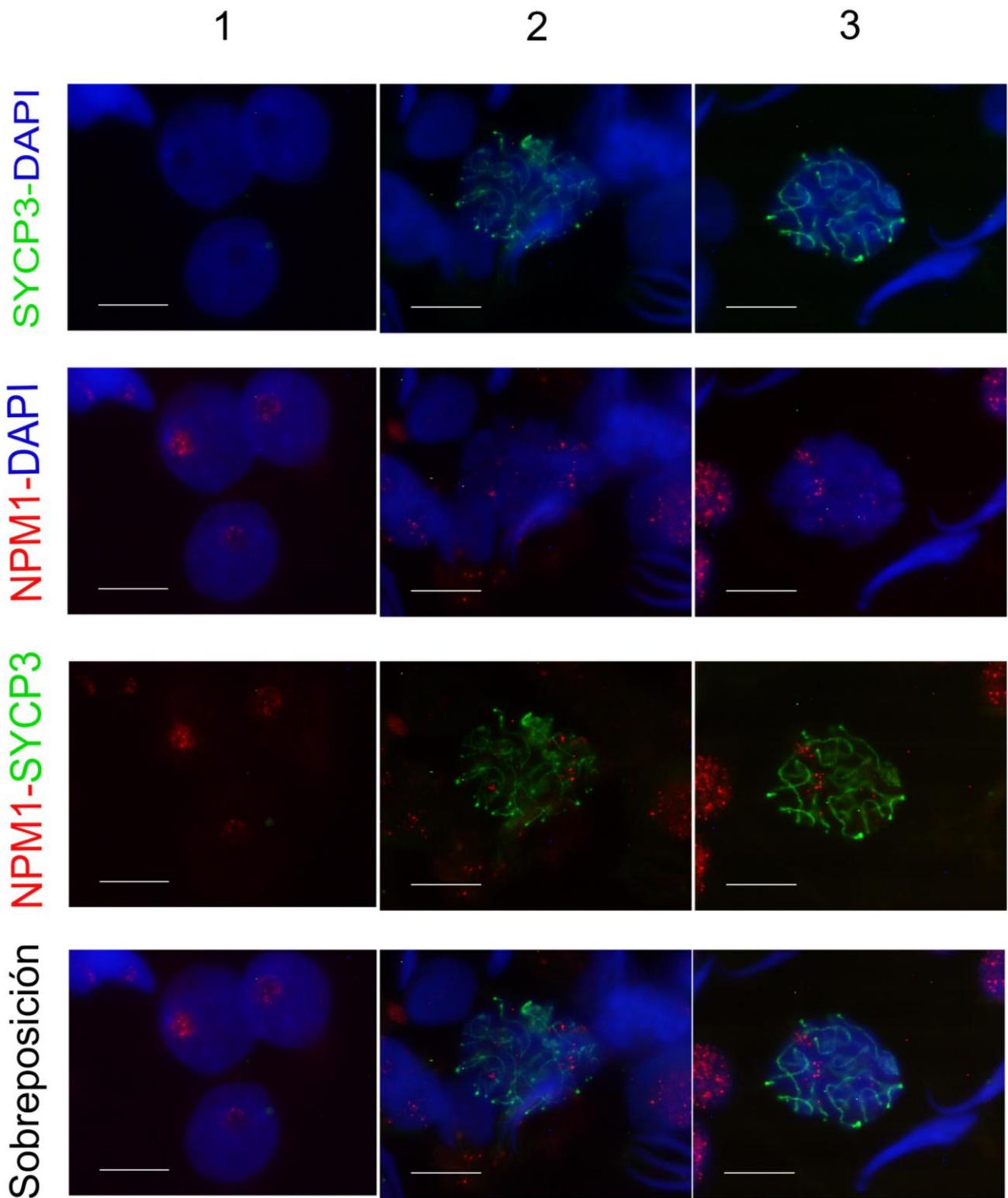


Figura 32. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Célula de Sertoli. 2) Espermatocito primario en fase de Leptonema. 3) Espermatocito primario en fase de Cigotema. Inmunodetección de proteínas nucleolares NPM1 y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μ m.

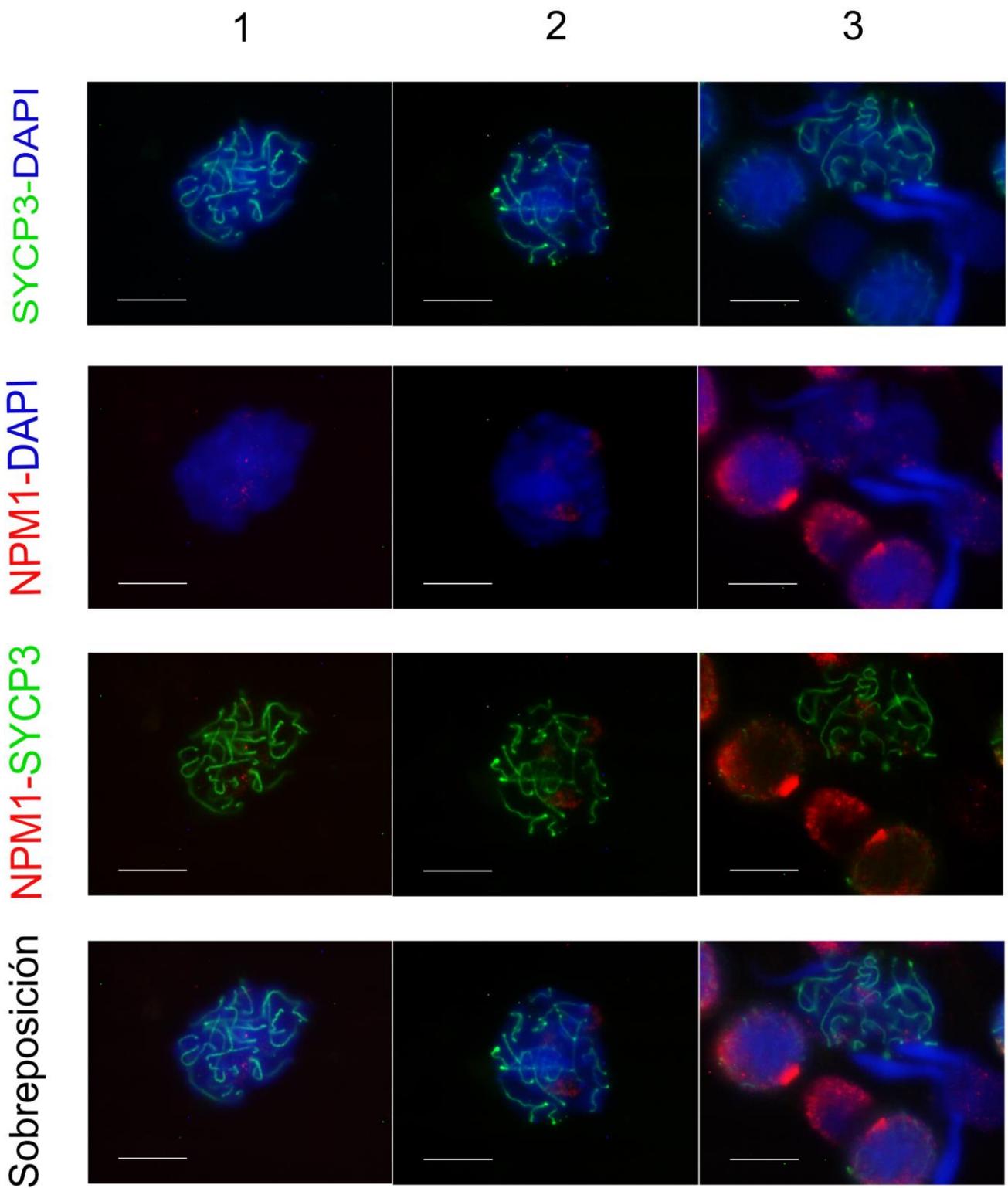


Figura 33. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Temprano. 2) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Medio. 3) Espermatocito primario en fase de Paquiteno Tardío. Inmunodetección de proteínas nucleolares NPM1 y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μ m.

1

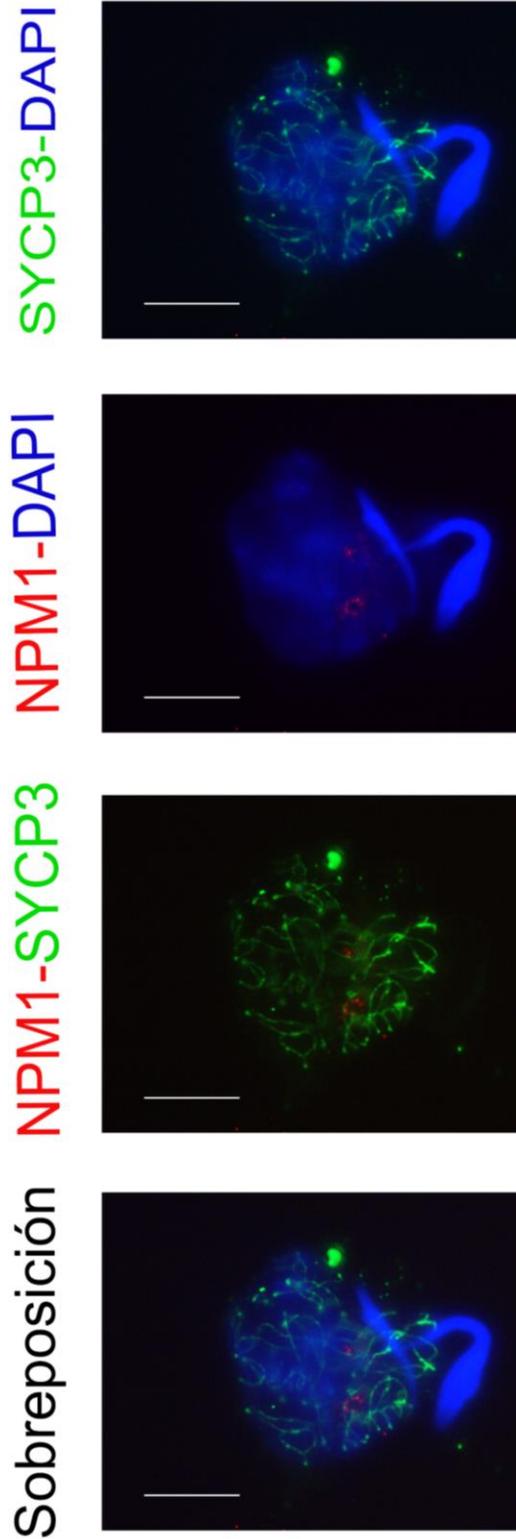


Figura 34. Dispersiones de túbulos seminíferos. 1) Espermatocito primario en fase de Diploteno. Inmunodetección de proteínas nucleolares NPM1 y SYCP3 con DAPI. Barra 10 μm.

Discusión

En este trabajo, se evidenció que los espermatoцитos primarios presentaron fragmentación nucleolar, mediante la presencia de diferentes proteínas nucleolares, ya que en las fases de preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno temprano, medio, tardío y diploteno, se observó la colocalización de marcadores para dos de los tres componentes del nucléolo. Mientras que el análisis estadístico indicó una tendencia a la reducción del número de fragmentos nucleolares conforme avanza la profase meiótica I. Finalmente, la dinámica de los fragmentos y proteínas nucleolares presentó una relación con el movimiento cromosómico que se presenta durante la profase meiótica I.

Fragmentación del nucléolo durante la profase meiótica I

Durante el ciclo celular existen cambios en el nucléolo en su composición, actividad y movimiento de proteínas, lo que provoca se presente el desensamblaje y ensamblaje del dominio nuclear durante la división celular tipo mitosis, dichos cambios se conocen como nucleogénesis (**Boisvert y col., 2007; Moriella-Souza y Azeredo-Oliveira, 2008; Hernandez-Verdun, 2011; en Olson, 2011; Lara-Martínez et al., 2016; Nepomuceno-Mejía et al., 2016**). En cuanto a la división celular tipo meiosis solo se ha descrito la estructura y actividad del nucléolo durante la espermatogénesis en mamíferos (**Hofgärtner et al., 1979; Paniagua et al., 1986; Schultz y Leblond, 1990; Peruquetti et al., 2008; Peruquetti et al., 2012**), sin embargo, pocos estudios de este dominio nuclear se han enfocado a detallar lo que sucede en cada etapa de la profase meiótica I. Por lo cual, en el presente trabajo, se evaluó la dinámica del nucléolo y la distribución de proteínas nucleolares mediante técnicas histológicas y de inmunolocalización de proteínas nucleolares en cortes y dispersiones de testículo de rata adulta.

De las observaciones realizadas a nivel de microscopía óptica con la técnica de AgNOR en los cortes de parafina y las dispersiones, se sugiere que el nucléolo se fragmenta parcialmente al inicio de la profase meiótica I, desde preleptoteno hasta paquiteno tardío, finalizando en una reorganización de estos fragmentos en una o dos entidades durante la fase de diploteno; estos resultados coinciden con las observaciones realizadas en la espermatogénesis de rata, ratón y conejo (**Takeuchi y Takeuchi, 1990; Peruquetti et al., 2008; Peruquetti et al., 2012**). Por otra parte, esta fragmentación del nucléolo puede ser consecuencia del proceso meiótico que

está transcurriendo, en donde está aconteciendo la fase S meiótica (preleptoteno), el reconocimiento de cromosomas homólogos (leptoteno), la sinapsis (cigoteno) y la recombinación (paquiteno) (**Scherthan et al., 2007; Morelli et al., 2008**).

Con respecto a la cuantificación de los cúmulos de AgNOR (técnica que impregna regiones organizadoras del nucléolo y proteínas afines a la plata, por lo que les llamaremos como fragmentos nucleolares) se observó una tendencia a la disminución del número de cúmulos conforme avanza la profase meiótica I, donde se observaron alrededor de 2 a 6 cúmulos en células en espermatoцитos primarios en etapa de preleptoteno; 1 a 6 cúmulos en células en etapa de leptoteno, cigoteno y paquiteno tardío; 1 a 5 cúmulos en células en paquiteno temprano; 1 a 4 cúmulos para la etapa de paquiteno medio y de 1 a 3 cúmulos en células en etapa de diploteno. Estas observaciones son similares a las realizadas por **Hofgärtner y col. (1979)**, quién observó una tendencia a la disminución en el número de marcas de AgNOR durante la profase meiótica I en humanos, ratas, ratones y hámsters.

Naturaleza de los fragmentos nucleolares durante la profase meiótica I

El número de cúmulos observadas durante la profase meiótica I, puede deberse a que la técnica de impregnación argéntica (AgNOR), muestra argirofilia por las regiones organizadoras del nucléolo (NORs) y por ciertas proteínas nucleolares (**Treré, 2000; Canet y col., 2001**) como lo son Fibrilarina, Nucleolina y Nucleofosmina que se encuentran en el centro fibrilar (CF), el componente fibrilar denso (CFD) y el componente granular (CG), ya que dichas proteínas presentan en su dominio N-terminal regiones ácidas ricas en residuos de glutamato y aspartato, lo que les confiere afinidad por la plata (**Boisvert y col., 2007; en Olson, 2011**).

Otra explicación del porqué varía el número de cúmulos o fragmentos nucleolares durante las etapas de la profase meiótica se debe a la impregnación de los NORs. Los cuales migran a los cromosomas acrocéntricos en la mayoría de las especies o al sitio de las constricciones secundarias (**en Gómez-Álvarez y col, 2002; Wnuk et al., 2012; Stimpson et al., 2014**). Se ha descrito que la rata (*Rattus norvegicus*) presenta 3 cromosomas acrocéntricos (3, 11 y 12) (**Hofgärtner et al., 1979; Canet y col., 2001; Badenhorst y col., 2011**), por lo que en cortes histológicos es posible encontrar hasta 3 cúmulos impregnados. Sin embargo, es posible que durante la replicación del ADN durante la fase S meiótica en el preleptoteno (**Muñoz-Velasco et al., 2013**), estos 3 cúmulos se muestran duplicados como una consecuencia de la fase S

meiótica, y por lo tanto los espermatoцитos primarios en profase meiótica que tienen el $2n$ duplicado, provoque la presencia de 6 cromosomas acrocéntricos y por lo tanto hasta 6 cúmulos impregnados.

Dinámica de los fragmentos nucleolares durante la profase meiótica I

Otra cualidad de los fragmentos nucleolares impregnados con el método del AgNOR durante los estadios de la profase meiótica I, que fue evidenciada en las dispersiones, es su distribución preferencial hacia la periferia nuclear en el preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno temprano, medio y tardío, mientras que en diploteno se mostraron con una distribución aleatoria dentro del núcleo, lo que coincide con resultados de otros investigadores en cortes histológicos de testículo de conejo **(Peruquetti et al., 2012)**.

Considerando lo anterior, la distribución y localización de los fragmentos nucleolares en la periferia nuclear puede relacionarse con su posición en los cromosomas, así como con los movimientos cromosómicos que se presentan durante la profase meiótica I (proceso caracterizado en *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Caenorhabditis elegans*), dicho movimiento se ha estudiado a través del comportamiento de los telómeros, ya que estos se encuentran adosados a la envoltura nuclear y ensamblan un complejo protéico transmembranal conocido como “enlace entre el núcleoesqueleto y citoesqueleto” (ENC), el cual facilita los movimientos cromosómicos mediados por los telómeros a lo largo de la envoltura nuclear **(Shibuya et al., 2014; Lee et al., 2015)**.

Mientras tanto en mamíferos, se ha descrito al movimiento rotatorio del núcleo en espermatoцитos de roedores como consecuencia del movimiento de los telómeros en la envoltura nuclear **(Parvinen y Soderstrom, 1976)**, sin embargo, estudios recientes han caracterizado la presencia de diversas proteínas como SUN1 (proteína relacionada con la distribución de los telómeros a la periferia nuclear), KASH5 (proteína asociada a dineína y dinactina), TERB1, TERB2 (proteínas de formación del *bouquet* y de unión a secuencias teloméricas), MAJIN (proteína de anclaje a membrana) y TRF1 (factor de unión a TTAGGG) en la participación del anclaje de los telómeros a la envoltura nuclear y en el movimiento de los cromosomas **(Shibuya et al., 2014; Shibuya et al., 2015)**.

También se ha descrito la funcionalidad de dos elementos del citoesqueleto como la actina y los microtúbulos; donde se ha determinado a la actina como responsable de la oscilación de la forma nuclear, mientras que los microtúbulos al unirse con los telómeros son responsables del movimiento rápido de los cromosomas. Por lo que, el movimiento cromosómico está acompañado de un movimiento rotatorio en las etapas de leptoteno, cigoteno, paquiteno y en diploteno a pesar de que en esta etapa disminuye el movimiento cromosómico, ya que la acumulación de la proteína SUN1 se reduce hacia las fases de paquiteno tardío y diploteno, causando un cese en el movimiento de los cromosomas, debido a que esta proteína se encuentra regulando la interacción entre los microtúbulos y los telómeros (**Shibuya et al.,2014; Lee et al., 2015**).

Estudios recientes han caracterizado la distribución de los telómeros y cromosomas durante la profase meiótica I, por ejemplo, **Morelli et al. (2008)** describe que el movimiento de los cromosomas se observa desde cigoteno hasta diploteno, en el cual los telómeros se distribuyen alrededor del núcleo; sin embargo, **Scherthan (2001)** menciona que durante la etapa de preleptoteno los telómeros transitan a la periferia nuclear y durante el leptoteno los telómeros de algunos cromosomas se anclan a la envoltura nuclear, mientras que en la etapa de cigoteno se presenta la formación del “*bouquet*”, donde los cromosomas se encuentran alineados debido al movimiento telomérico y es durante el paquiteno que se da la sinapsis entre cromosomas homólogos mientras que los telómeros se dispersan sobre la envoltura nuclear. Por lo cual, los resultados obtenidos en este trabajo señalan una relación entre los fragmentos nucleolares observados en la periferia de los núcleos durante la profase meiótica I que coincide con los movimientos de los telómeros y cromosomas durante las etapas estudiadas.

Dinámica de las proteínas nucleolares durante la profase meiótica I

Por otro lado, las observaciones realizadas de las proteínas nucleolares Fibrilarina (CF), Nucleolina (CFD) y Nucleofosmina-NPM1 (CG) en las células de Sertoli demuestran que se ubican en el mismo sitio, esta disposición ha sido también observada por **Paniagua et al. (1986)**. A diferencia de lo que se observó en la célula de Sertoli las células germinales en profase meiótica I mostraron varias marcas de estas proteínas además de que en ocasiones colocalizaron y en otras no. Esto nos sugiere que al menos dos de los tres o incluso los tres

compartimentos de nucléolo están presentes durante toda la profase meiótica. Este análisis coincide con estudios a nivel de microscopía electrónica donde describen la morfología bi o tripartita del nucléolo dependiendo de la etapa de la profase meiótica (**Paniagua et al., 1986; Schultz y Leblond, 1990; Sousa, y Carvalheiro, 1994**)

En cuanto a las inmunodetecciones dobles en el material dispersado se establece la distribución de las proteínas nucleolares relacionada con la etapa de la profase meiótica; esto es con la localización de la proteína SYCP3 (Complejo sinaptonémico-CS) con Fibrilarina (CF), de SYCP3 (CS) con Nucleolina (CFD) y de SYCP3 (CS) con Nucleofosmina-NPM1 (CG). Las inmunolocalizaciones evidencian la distribución de las proteínas nucleolares hacia la periferia nuclear, además de demostrar que la fibrilarina, la nucleolina y la nucleofosmina se encuentran adosadas a sus cromosomas gracias a la presencia de la proteína estructural del complejo sinaptonémico SYCP3.

Funcionalidad del nucléolo durante la profase meiótica I

Una cualidad importante de estas proteínas es su dominio C-terminal que contiene residuos de glicina, arginina y fenilalanina conocidos como GAR. Este dominio favorece la interacción con los ácidos nucleicos, específicamente con los sitios de unión al ARN (**Vázquez, 2003; Boisvert y col., 2007; Olson; 2011**). Debido a lo anterior, diversos autores han relacionado la presencia de precipitados de plata (AgNOR) y la de algunas proteínas, como Nucleolina, con la actividad transcripcional del nucléolo (**Biggiogera, et al., 1991; Tuteja y Tuteja, 1998; Ginisty, et al., 1999; Treré, 2000; Canet y col., 2001; Matía, 2008**), de modo que, la presencia de esta proteína durante toda la profase meiótica I sugiere que la actividad del nucléolo no cesa como ha sido sugerida por algunos autores. Asimismo, la Nucleolina está asociada al CFD y estudios realizados por **Jiménez-García et al. (1993)** indican que los genes ribosomales se encuentran activos en este componente nucleolar.

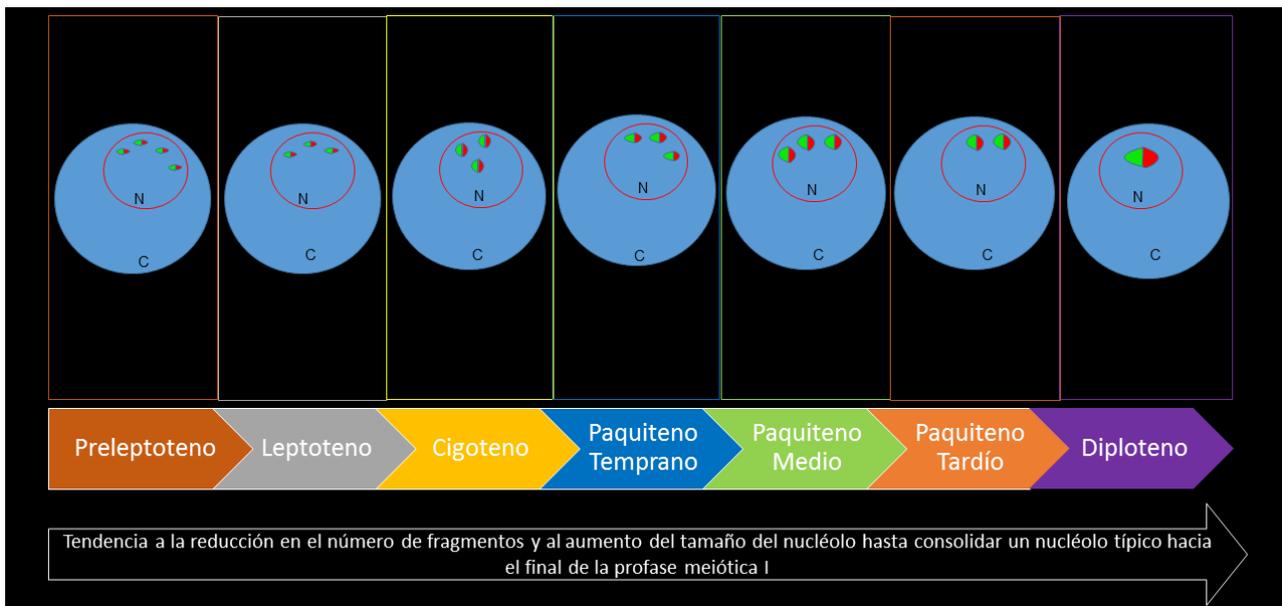
Por su parte, diversos estudios han intentado vislumbrar si la actividad del nucléolo durante la profase meiótica I cesa completamente o se presenta en alguna de las etapas, ya que autores como **Stefanini et al., (1974); Schultz-Leblond (1990)** mencionan que la actividad del nucléolo se presenta en las primeras etapas de la profase meiótica I y que existe un pico en la actividad durante la etapa de paquiteno, mientras que decae durante el diploteno y etapas posteriores a la profase meiótica I hasta una completa inactividad en las espermátidas

elongadas. Sin embargo, **Peruquetti et al. (2012)** mencionan que la actividad va decayendo conforme avanza la profase meiótica I.

Los resultados de este trabajo demuestran que el nucléolo se fragmenta y los fragmentos nucleolares tienen una dinámica nuclear dependiente de los movimientos cromosómicos, sin embargo, la impregnación argéntica y las inmunodetecciones de proteínas nucleolares nos sugieren que estos fragmentos siempre están activos. Por lo que proponemos que, a pesar de que los movimientos cromosómicos dictan la dinámica de la fragmentación y distribución de los fragmentos nucleolares estos continúan activos durante la profase meiótica I en su proceso de nucleogénesis meiótica.

Conclusiones

- Durante la profase meiótica I, las células presentan una fragmentación parcial del nucléolo.
- La distribución de las proteínas nucleolares Fibrilarina, Nucleolina y Nucleofosmina tiende a ser periférica durante toda la profase meiótica I.
- Las proteínas Fibrilarina (CF) y Nucleolina (CFD) colocalizan en toda la profase meiótica I.
- Las proteínas Fibrilarina (CF) y Nucleofosmina (CG) colocalizan en toda la profase meiótica I.
- Las células de la profase meiótica I presentan una tendencia a la reducción del número de fragmentos nucleolares conforme avanza el proceso meiótico.
- La reducción del número de fragmentos nucleolares conlleva a un aparente aumento del tamaño nucleolar conforme avanza la profase meiótica I.
- Es importante mencionar que el nucléolo no se comporta de la misma forma durante la meiosis que durante la mitosis, sin embargo, durante la profase meiótica I se presenta una fragmentación parcial del nucléolo y con ello una redistribución de sus fragmentos hasta consolidarse en una o dos entidades; resultado del proceso meiótico y del movimiento cromosómico.



Referencias

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Roberts, K. y Walter, P. (2008). *Biología molecular de la célula* (5ta edi). Espana: OMEGA.
2. Amin, M.A., Matsunaga, S., Ma, N., Takata, H., Yokoyama, M., Uchiyama, S. y Fukui, K. (2007) Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and celular growth in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 320-326.
3. Badenhorst, D., Dobigny, G., Adegá, F., Chaves, R., O'Brien, P.C.M., Ferguson-Smith, M.A., Waters, P.D. y Robinson, T.J. (2011) Chromosomal evolution in Rattini (Muridae, Rodentia) *Chromosome Res* 709-727.
4. Berrios, M. (1998). *Nuclear structure and function*. United States of America: Academic Press.
5. Biggiogera, M., Kaufmann, S.H., Shaper, J.H., Gas, N., Amalric, F. y Fakan, S. (1991). Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. *CHROMOSOMA*, 162-172.
6. Biggiogera, M., Bottone, M. G., Scovassi, A. I., Soldani, C., Vecchio, L. y Pellicciari, C. (2004). Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. *Biology of the Cell, Elsevier*, 603-615.
7. Boisvert, F. M., Van Koningsbruggen, S., Navascues, J. y Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature*, 8, 574-585.
8. Boron, W.F. y Boulpaep E.L. (2012). *Medical physiology* (2nd ed). EUA: Elsevier Saunders
9. Box, J.K., Paquet, N., Adams, M.N., Boucher, D., Bolderson, E., O'Byrne, K.J. y Richard, D.J. (2016) Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Molecular Biology*. 12 pp.
10. Branco, M.R. y Pombo, A. (2007) Chromosome organization: new facts, new models. *TRENDS in Cell Biology*

11. Brusco, H.A., López Costa, J.J. y Loidl, C.F. (2014). *Histología médico-práctica*. España: Elsevier.
12. Canet, V., Montmasson, M-P., Usson, Y., Giroud, F. y Brugal, G. (2001) Correlation between silver-stained nucleolar organizer region area and cell cycle time. *Cytometry*, 110-116.
13. Cohen, P. E. y Holloway, J. K. (2015). Mammalian Meiosis. In *Physiology of Reproduction* (Fourth Ed, p. 53). United States of America: Elsevier Inc.
14. Colombo, E., Bonetti, P., Denchi, E.L., Martinelli, P., Zamponi, R., Marine, J-C., Helin, K., Falini, B. y Pelicci, P.G. (2005) Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19^{Arf} protein stability. *Molecular and Cellular biology*. 8874-8889.
15. Costa, Y., Speed, R., Ollinger, R., Alsheimer, M., Semple, C.A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Hoog, C., Benavente, R. y Cooke, H.J. (2005) Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *Journal of Cell Science*
16. Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M. y Benavente R. (2012) The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination *Exp. Cell. Res.*
17. Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. y Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Elsevier Inc*, 17-42.
18. Gartner, L. P. y Hiatt, J. L. (2002). *Texto Atlas de Histología* (Second edi). Mexico: McGraw- Hill.
19. Gerbi, S. A., Borovjagin, A. V. y Lange, T. S. (2003). The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Cell Biology*, 15, 318-325.
20. Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. y Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science*, 761-772.
21. Gómez-Álvarez, R.P., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R. y Sáez, F.J. (2002). *Citología e Histología vegetal y animal*. 3ra Ed. Mc Graw Hill.

22. Gómez, H.L., Felipe-Medina, N., Sánchez-Martín, M., Davies, O.R., Ramos, I., García-Tuñón, I., de Rooij, D.G., Dereli, I., Tóth, A., Barbero, J.L., Benavente, R., Llano, E. y Pendas, A.M. (2016) C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nature Communication*
23. Harper, L., Golubovskaya, I. y Cande W.Z. (2004) A *bouquet* of chromosomes. *Journal of Cell science*, 4025-4032.
24. Hernández-Hernández, A., Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M. y Recillas-Targa, F. (2009) Chromatin structure contribution to the synaptonemal complex formation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1198-1208.
25. Hernandez-Verdun, D. (2006). The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol*, 135-148.
26. Hernandez-Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, 189-194.
27. Hofgartner, F.J., Schmid, M., Krone, W., Zenzes, M.T. y Engel, W. (1979) Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *CHROMOSOMA*. 197-216.
28. Hunter, N. (2013). Meiosis. *Elsevier Inc*, 17-23.
29. Leary, D. J. y Huang, S. (2001). Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *Elsevier Science*, 145-150.
30. Leblond, C.P. y Clermont Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N Y Acad. Sci.* 548-569.
31. Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., Ochs, R.L., Echeverría, O.M., Vázquez-Nin, G.H. y Busch, H. (1993) Electron microscopic localization of ribosomal DNA in rat liver nucleoli by nonisotopic *in situ* hybridization. *Experimental Cell Research*. 220-225.
32. Jiménez, G. L. F. y Merchant, L. H. (2003). *Biología celular y molecular*. 1ra ed. México. Pearson Educación

33. Jiménez-García, L.F., Zavala, G., Chávez-Mungía, B., Ramos-Godínez, M.P., López-Velázquez, G., Segura-Valdez, M.L., Montañez, C., Hehl, A.B., Arguello-García, R. y Ortega-Pierres, G. (2008) Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. International Journal for Parasitology. 1297-1304.
34. Kardong, K.V. (2012). Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution. (6th ed). EUA: McGraw Hill.
35. Karp, G. (2008). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimento* (Quinta edi). Mexico: McGraw-Hill.
36. Kouznetsova A, Benavente R, Pastink A, Ho "o "g C (2011) Meiosis in Mice without a Synaptonemal Complex. PLoS ONE.
37. Lara-Martínez, R., Segura-Valdez, M.L., de la Mora-de la Mora, I., López-Velázquez, G. y Jiménez-García, L.F. (2016) Morphological studies of Nucleologenesis in *Giardia lamblia*. The Anatomical Record.
38. Lamaye, F., Galliot, S., Alibardi, L., Lafontaine D.L.J. y Thiry, M. (2011) Nucleolar structure across evolution: the transition between bi- and tricompartmentalized nucleoli lies within the class Reptilia. Journal of Structural Biology. 352-359.
39. Lee, C.H., Horn, H.F., Stewart, C.L., Burke, B., Bolcun-Filas, E., Schimenti, J.C., Dresser, M.E. y Pezza, R.J. (2015) Mechanism and regulation of rapid telomere prophase movements in mouse meiotic chromosomes. Cell Reports. 551-563.
40. Lo, S.J., Lee, C-C. y Lai, H-J. (2006) The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings Cell Research. 530-538.
41. López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M.L. y Jiménez-García, L.F. (2005) Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. Microscopy and Microanalysis. 293-299.
42. Lu, J., Gu, Y., Feng, J., Zhou, W., Yang, X. y Shen, Y. (2014) Structural Insight into the Central Element Assembly of the Synaptonemal Complex. Sci. Rep.

43. Mao, Y.S., Zhang, B. y Spector D.L. (2011) Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genetics*, 295-306.
44. Matia-Jurado, I. (2008). *La organización funcional del nucleolo, la proliferación y el ciclo celular en Arabidopsis thaliana. Alteraciones inducidas por cambios gravitatorios*. Universidad Autonoma de Madrid.
45. Mitrea, D. M., Cika, J.A., Guy, C.S., Ban, D., Banerjee, P.R., Stanley, C.B., Nourse, A., Deniz, A.A. y Kriwacki, R.W. (2016) Nucleophosmin integrates within the nucleolus via multi-modal interactions with proteins displaying R-rich linear motifs and rRNA. *Biophysics and structural biology*.
46. Mongelard, F. y Bouvet, P. (2006) Nucleolin: a multifaceted protein. *TRENDS in Cell Biology*
47. Morelli, M.A., Werling, U., Edelmann, W., Roberson, M.S. y Cohen, P.E. (2008) Analysis of meiotic prophase I in live mouse spermatocytes. *Chromosome Research*. 743-760
48. Morielle-Souza, A. y Azeredo-Oliveira, M.T.V., (2008) Study of the nucleolar cycle and ribosomal RNA distribution during meiosis in triatomines. *Micron*. 1020-1026
49. Muñoz-Velasco, I. Ortiz, R., Echverría, O.M., Escobar, M.L. y Vázquez-Nin, G.H (2013) Characterization of the Pre-meiotic S phase through incorporation of BrdU during Spermatogenesis in the rat. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 680-689
50. Nepomuceno-Mejía, T., Lara-Martínez, R., Hernández, R., Segura-Valdez, M.L. y Jiménez-García, L.F. (2016) Nucleologogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis*. 621-629.
51. Newton, K., Petfalski, E., Tollervey, D. y Caceres, J.F. (2003) Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intro-encoded small nucleolar RNA in the mouse. *Molecular and Cellular Biology*. 8519-8527.
52. Olson, M. O. J. (2004). Sensing Cellular Stress: another new function for the nucleolus? *Science*, 1-4.
53. Olson, M.O.J. (2011) *The nucleolus*. USA. Springer

54. Olson, M.O.J., Hingorani, K. y Szebeni, A. (2002) Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *International Review of Cytology*
55. Paniagua, R., Nistal, M., Amat, P. y Rodríguez M.C. (1986) Ultrastructural observations on nucleoli and related structures during human spermatogenesis. *Anatomy and Embriology*. 301-306.
56. Parvinen, M. y Soderstrom, K.O. (1976) Chromosome rotation and formation of sinapsis. *Nature*.
57. Peruquetti, R. L., Assis, I. M., Taboga, S. Ro. y Vilela de Azeredo-Oliveira, M. T. (2008). Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat and mouse spermiogenesis. *Elsevier Inc*, 419-425.
58. Peruquetti, R. L., Taboga, S. R. y Vilela de Azeredo-Oliveira, M. T. (2012). Morphological Changes of Mammalian Nucleoli during Spermatogenesis and Their Possible Role in the Chromatoid Body Assembling. *Cell Biology*, 1-12.
59. Ploton, D., Thiry, M., Menager, M., Lepoint, A., Adnet, J.J. and Goessens, G. (1987) Behavior of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the Ag-NOR staining procedure. *Chromosoma*. 95-107.
60. Prieto, J.L. y McStay, B. (2005). Nucleolar biogenesis: the first small steps. *Biochemical Society*, 33, 1441-1443.
61. Russell, L. D. y col (1990) "Histological and Histopathological evaluation of the testis", (1ra ed.) United States, Cache River Press
62. SAGARPA (México). SENASICA [en línea]: NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [fecha de consulta: 2016]. Disponible desde <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>
63. Scherthan, H. (2001) A *bouquet* makes ends meet. *Nature Reviews Molecular cell biology*. 621-627.

64. Scherthan, H., Wang, H., Adelfalk, C., White, E.J., Cowan, C., Cande, W.Z. y Kaback, D.B. (2007) Chromosome mobility during meiotic prophase in *Saccharomyces cerevisiae*. PNAS. 16934-16939.
65. Schmid, M., Loser, C., Schmidtke, J. y Engel, W. (1982) Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. Chromosoma. 149-179.
66. Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Hoog C, et al. (2011) A Novel Mouse Synaptonemal Complex Protein Is Essential for Loading of Central Element Proteins, Recombination, and Fertility. PLoS Genet.
67. Schultz, M.C. y Leblond, C.P. (1990) Nucleolar structure and synthetic activity during meiotic prophase and spermiogenesis in the rat. The American Journal of Anatomy. 1-10.
68. Schwarzacher, H.G. y Mosgoeller, W. (2000) Ribosome biogenesis in man: Current views on nucleolar structures and function. Cytogenetics and Cell Genetics, 243-252.
69. Shibuya, H., Morimoto, A. y Watanabe, Y. (2014) The dissection of meiotic chromosome movement in mice using an *in vivo* electroporation technique. PLOS GENETICS.
70. Shibuya, H., Hernández-Hernández, A., Morimoto, A., Negishi, L., Hoog, C. y Watanabe, Y. (2015) MAJIN links telomeric DNA to the nuclear membrane by exchanging telomere cap. Cell Press. 1-15.
71. Smetana, K. (1967). Basic histochemical and cytochemical methods, in: Methods in Cancer Research. Vol II, Academic Press, New York.
72. Sonderstrom, K.O. (1976) Characterization of RNA synthesis in mid-pachytene spermatocyte of the rat. Experimental Cell Research.
73. Sousa, M y Carvalheiro, J. (1994) A cytochemical study of the nucleolus and nucleolus-related structures during human spermatogenesis. Anatomy and Embriology. 479-487.
74. Stefanini, M., Martino, C., D'A-Gostino, A., Agrestini, A. y Monesi, V. (1974) Nucleolar activity of rat primary spermatocytes. Experimental Cell Research.

75. Stimpson, K.M., Sullivan, L.L., Kuo, M.E. y Sullivan B.A. (2014) Nucleolar organization, ribosomal DNA array stability, and acrocentric chromosome integrity are linked to telomere function. PLOS ONE.
76. Takeuchi, I.K. y Takeuchi, Y.K. (1990) Etanol-phosphotungstic acid and bis-muth staining os spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. J. Struct. Biol. 104-112.
77. Thiry, M. y Lafontaine, D. L. J. (2005). Birth of a nucleolus: evolution of nucleolar compartments. *Elsevier Inc*, 15, 194-199.
78. Thiry, M., Lamaye, F. y Lafontaine, D. L. J. (2011) The nucleolus: When two became three. *Nucleus*. 289-293.
79. Tres, L.L. (1975) Nucleolar RNA synthesis of meiotic prophase spermatocytes in the human testis. *Chromosoma*. 141-151.
80. Tretê, D. (2000) AgNOR staining and quantification *Micron* 127-131
81. Tuteja, R. y Tuteja, N. (1998). Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Biochemistry and Molecular Biology*, 407-436.
82. Vazquez Echeverria, C. (2003). *El nucléolo de la amiba Entamoeba histolytica*. Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
83. Weis, B.L., Kovacevic, J., Missbach, S. y Schleiff, E. (2015) Plant specific features of ribosome biogénesis. *Trends in Plant Science*. 12 pp.
84. Wnuk, M., Villagómez, D.A.F., Bugno-Poniewierska, M., Tumidajewicz, P., Carter, T.F. y Slota, E. (2012) Nucleolar organizar regions (NORs) distribution and behavior in spermatozoa and meiotic cells of the horse (*Equus caballus*) *Theriogenology* 579-587

Anexos

1) Protocolos para Impregnación argéntica (Diagrama de flujo 1)

Una vez desparafinados e hidratados los cortes de parafina, se lavaron con agua destilada dos veces durante 10 min cada uno. Para llevar a cabo la impregnación de los RONs se preparó una solución de nitrato de plata al 50% en agua destilada (J.T. Baker, Lot T49C05) a lo que posteriormente se le agregó una solución de gelatina con ácido fórmico, la proporción de cada una de estas soluciones es de [2:1]. La solución de nitrato de plata al 50%, así como la mezcla con gelatina-ácido fórmico es necesario protegerlas de la luz ya que son fotosensibles. La solución de trabajo se prepara en el momento. Los cortes se incubaron en la solución de trabajo de nitrato de plata durante 45 min protegidos de la luz. Posteriormente, se lavaron con agua destilada dos veces durante 10 min cada uno y se deshidrató en alcoholes graduales durante 10 min en cada uno. Los cortes se aclararon en xilol por 10 min y se montaron con resina sintética (SIGMA).

NOTA: Durante todo el procedimiento se debe usar instrumental de plástico para el manejo de las preparaciones y recipientes de vidrio para preparar las soluciones, ya que la plata precipita con el metal y mancha los recipientes de plástico. La cristalería en la que se prepare la plata debe enjuagarse muy bien con agua destilada antes de lavarse, debido a que las sales del agua corriente precipitan la plata. Asimismo, no debe montarse con medio de montaje Entellan, ya que se disuelve el precipitado de plata metálica y se pierde la impregnación.

Técnica de impregnación argéntica para organizadores nucleolares (AgNOR) en parafina y dispersiones

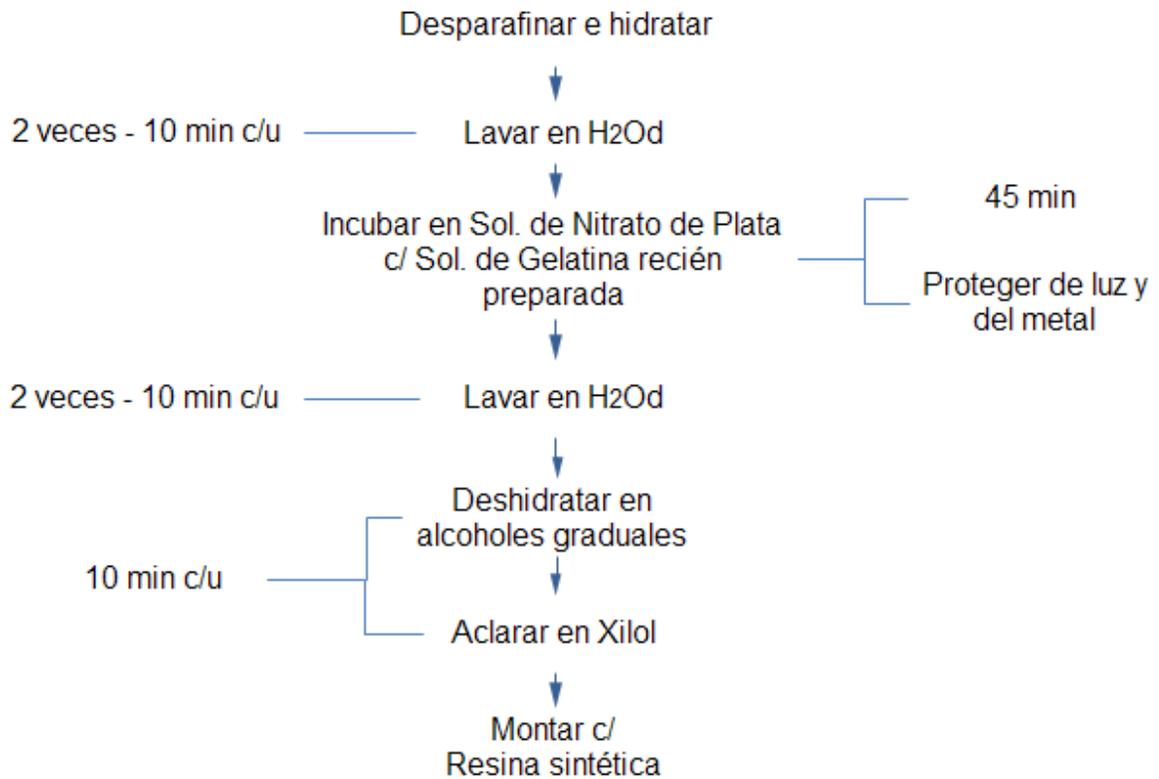


Diagrama de flujo 1. Protocolo para la técnica de AgNOR en cortes de parafina y en dispersiones.

2) Protocolos de Inmunodetecciones dobles en parafina (Diagrama de flujo 2)

a. Detección de Fibrilarina (CF) - Nucleolina (CFD) - DAPI (ADN)

Ya desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS 5 minutos en agitación, se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos 1X a pH 6 en microondas (Antigen Retrieval Citra Plus No Cat HK 080-9K de Biogenex) en potencia 10 durante 3 minutos y en potencia 3 por 6 minutos y se deja enfriar por 30 minutos. Posteriormente se enjuagaron con PBS y se bloquearon con glicina 100 mM diluida en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-Fibrilarina hecho en ratón (Abcam, Cat. Ab466, Lot. GR760013) y con anti-Nucleolina hecho en conejo (Bethyl, Cat. IHC-00083, Lot. IHC-00083-1) en una concentración [1:50] y [1:100] respectivamente en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Una vez transcurrido este tiempo, se lavaron con TBST durante 5 minutos en agitación y después con PBS durante 5 minutos en agitación. Se preparó el anticuerpo secundario hecho en cabra contra ratón acoplado a RT (GAM IgG, Alexa, Cat. A-11005, Lot 1024061) y el anticuerpo secundario hecho en cabra contra conejo acoplado a FITC (GAR IgG, Alexa, Cat. F-2765, Lot. 764842) ambos en una concentración [1:200] diluidos en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidos de la luz. Se lavaron con TBST durante 5 minutos en agitación y después con PBS durante 5 minutos en agitación. Para finalizar se colocó una gota de DAPI en cada corte durante 1 minuto y después se lavaron con PBS durante 5 minutos en agitación y se montaron con medio para fluorescencia (Vectashield, No. Catálogo C0563, Lot.122139 marca Vector).

NOTA: la recuperación antigénica se hace en baño maría en un vaso koplín de plástico y en el cambio de potencia verificar que el volumen de la solución cubra por completo las laminillas. Las preparaciones no deben permanecer más de hora en la glicina, ya que esto afecta la inmunodetección y no deben secarse en ningún momento después durante su manipulación ya que esto afecta la inmunolocalización.

b. Detección de Fibrilarina (CF) - Nucleofosmina / NPM1 (CG) - DAPI (ADN)

Ya desparafinados e hidratados los cortes, se lavaron con PBS 5 minutos en agitación, se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos 1X a pH 6 en microondas (Antigen Retrieval Citra Plus No Cat HK 080-9K de Biogenex) en potencia 10 durante 3 minutos y en potencia 3 durante 6 minutos y se deja enfriar por 30 minutos. Posteriormente se enjuagaron en PBS, para después bloquear con glicina 100 mM diluida en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las preparaciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-Fibrilarina hecho en ratón (Abcam, Cat. Ab466, Lot. GR760013) y con anti-Nucleofosmina hecho en conejo (Bethyl, Cat. A-302-404A-T, Lot. A-302-404A-T-1) en una concentración [1:50] y [1:100] en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Una vez transcurrido ese tiempo, se lavaron con TBST durante 5 minutos en agitación y después con PBS durante 5 minutos en agitación. Se preparó el anticuerpo secundario hecho en cabra contra ratón acoplado a RT (Goat anti mouse IgG, Alexa, Cat. A-11005, Lot 1024061) y el anticuerpo secundario hecho cabra contra conejo acoplado a FITC (Goat anti rabbit IgG, Alexa, Cat. F-2765, Lot. 764842) ambos en una concentración [1:200] en PBS. Se incubó en los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegido de la luz. Transcurrido este tiempo, se lavaron con TBST durante 5 minutos en agitación y después con PBS durante 5 minutos en agitación. Posteriormente se colocaron en la cámara húmeda las preparaciones y se les aplicó en cada corte una gota de DAPI durante 1 minuto y se lavaron con PBS durante 5 minutos en agitación y se montaron con medio para fluorescencia (Vectashield, No. Catálogo C0563, Lot.122139 marca Vector).

NOTA: la recuperación antigénica se hace en baño maría en un vaso koplín de plástico y en el cambio de potencia verificar que el volumen de la solución cubra por completo las laminillas.

Inmunodetección doble (Fibrilarina-C23 y Fibrilarina-NPM1) en cortes por parafina

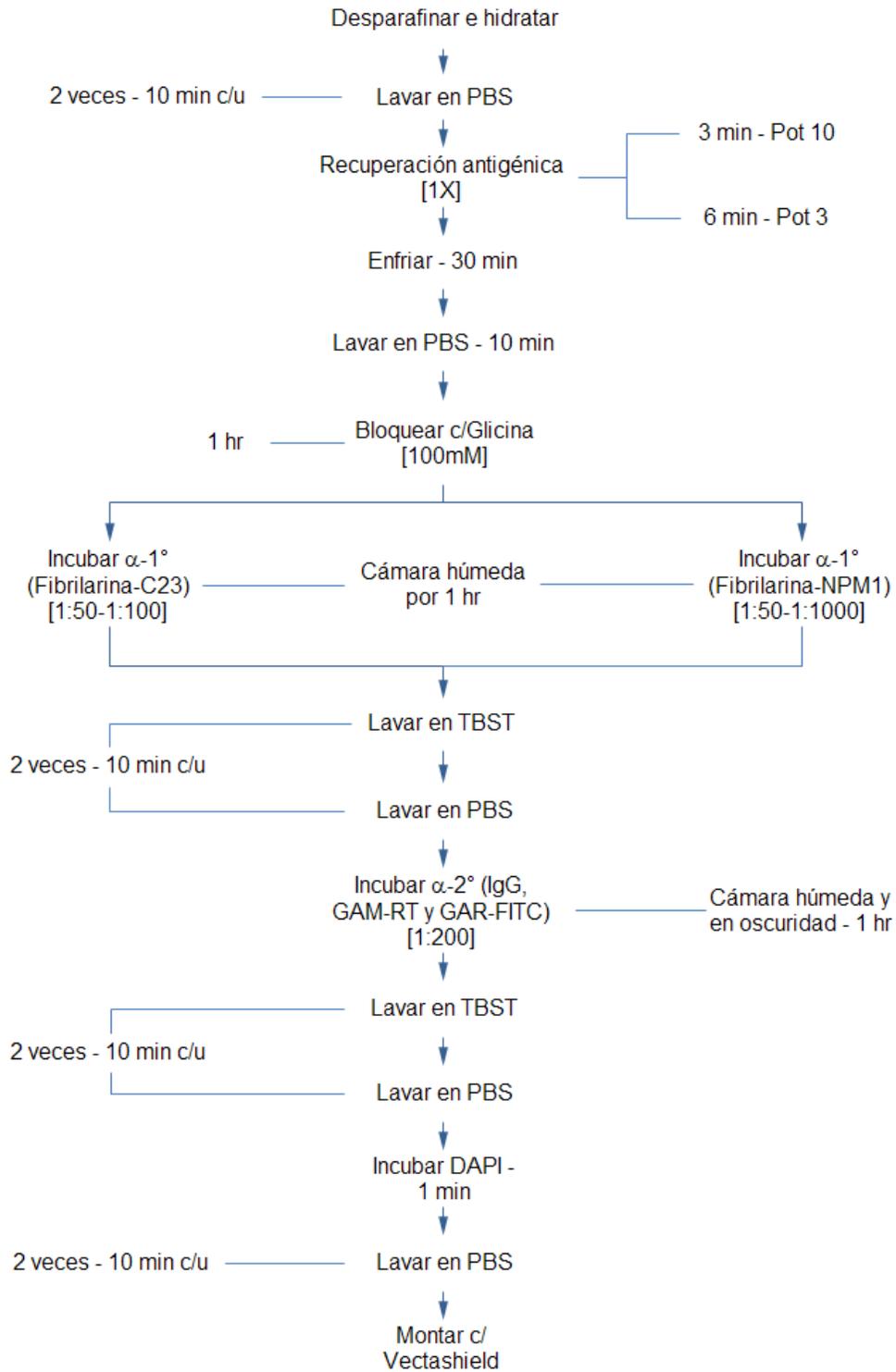


Diagrama de flujo 2. Protocolo de inmunodetección doble de Fibrilarina con Nucleolina y de Fibrilarina con NPM1 en cortes de parafina.

3) Protocolos de Inmunodetecciones dobles en dispersiones (Diagrama de flujo 3)

a. Detección de SYCP3 (CS) – Fibrilarina (CF) - DAPI (ADN)

Las dispersiones se lavaron con PBS durante 10 min, se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-SYCP3 hecho en conejo (Thermo, Cat. PA1-16766, Lot. PJ1923472) y con el anticuerpo anti-Fibrilarina hecho en ratón (Abcam, Cat. Ab466, Lot. GR760013) en una concentración [1:400] y [1:50] en PBS-BSA-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavaron dos veces con PBS-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación y después dos veces con H₂O-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación. Se preparó el anticuerpo secundario hecho en cabra contra conejo acoplado a FITC (GAR IgG, Alexa, Cat. F-2765, Lot. 764842) y el anticuerpo secundario hecho en cabra contra ratón acoplado a RT (GAM IgG, Alexa, Cat. A-11005, Lot 1024061), ambos en una concentración [1:200] en PBS, se incubaron las preparaciones durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidos de la luz. Se lavaron dos veces con PBS-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación y después dos veces con H₂O-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación. Posteriormente se colocó una gota de DAPI en cada preparación durante 1 minuto y se lavaron con PBS durante 5 minutos en agitación y se montaron con medio para fluorescencia (Vectashield, No. Catálogo C0563, Lot.122139 marca Vector).

b. Detección de SYCP3 (CS) - Nucleolina (CFD) - DAPI (ADN)

Las dispersiones se lavaron con PBS durante 10 min, se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-SYCP3 hecho en ratón (Abcam, Cat. AB97672, Lot. GR149989-1) y con anti-Nucleolina hecho en conejo (Bethyl, Cat. IHC-00083, Lot. IHC-00083-1), ambos en una concentración [1:100] en PBS-BSA-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se lavaron dos veces con PBS-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación y después dos veces con H₂O-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación. Se preparó el anticuerpo secundario hecho en cabra contra ratón acoplado a FITC (GAM IgG, Alexa, Cat. A11001, Lot. 1572559) y el anticuerpo secundario hecho en cabra contra conejo acoplado a RT (GAR IgG, Alexa, Cat. A11037, Lot. 1363574), ambos en una concentración [1:200] en PBS, las

preparaciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidas de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación en el anticuerpo secundario, se lavaron dos veces con PBS-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación y después dos veces con H₂O-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación. Para finalizar se colocó una gota de DAPI en cada corte durante 1 minuto y se lavaron con PBS durante 5 minutos en agitación y se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, No. Catálogo C0563, Lot.122139 marca Vector).

c. Detección de SYCP3 (CS) - Nucleofosmina / NPM1 (CG) - DAPI (ADN)

Las dispersiones se lavaron con PBS durante 10 min, se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las dispersiones, se incubaron con el anticuerpo primario anti-SYCP3 desarrollado en ratón (Abcam, Cat. AB97672, Lot. GR149989-1) y el anticuerpo anti-NPM1 hecho en conejo (Bethyl, Cat. A-302-404A-T, Lot. A-302-404A-T-1) en una concentración [1:100] y [1:1000]. Los anticuerpos se diluyeron en PBS-BSA-Tween y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron dos veces con PBS-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación y después dos veces con H₂O-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación. Se preparó el anticuerpo secundario hecho en cabra contra ratón acoplado a FITC (GAM IgG, Alexa, Cat. A11001, Lot. 1572559) y el anticuerpo secundario hecho en cabra contra conejo acoplado a RT (GAR IgG, Alexa, Cat. A11037, Lot. 1363574), ambos en una concentración [1:200] en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegida de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación para los anticuerpos secundario, se lavaron las preparaciones dos veces con PBS-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación y después dos veces con H₂O-Photoflo al 0.4% durante 10 minutos en agitación. Para finalizar se colocó una gota de DAPI en cada corte durante 1 minuto y se lavaron con PBS durante 5 minutos en agitación y se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, No. Cat. C0563, Lot.122139 marca Vector).

Imunodetección doble (SYCP3-Fibrilarina, SYCP3-C23 y SYCP3-NPM1) en dispersiones

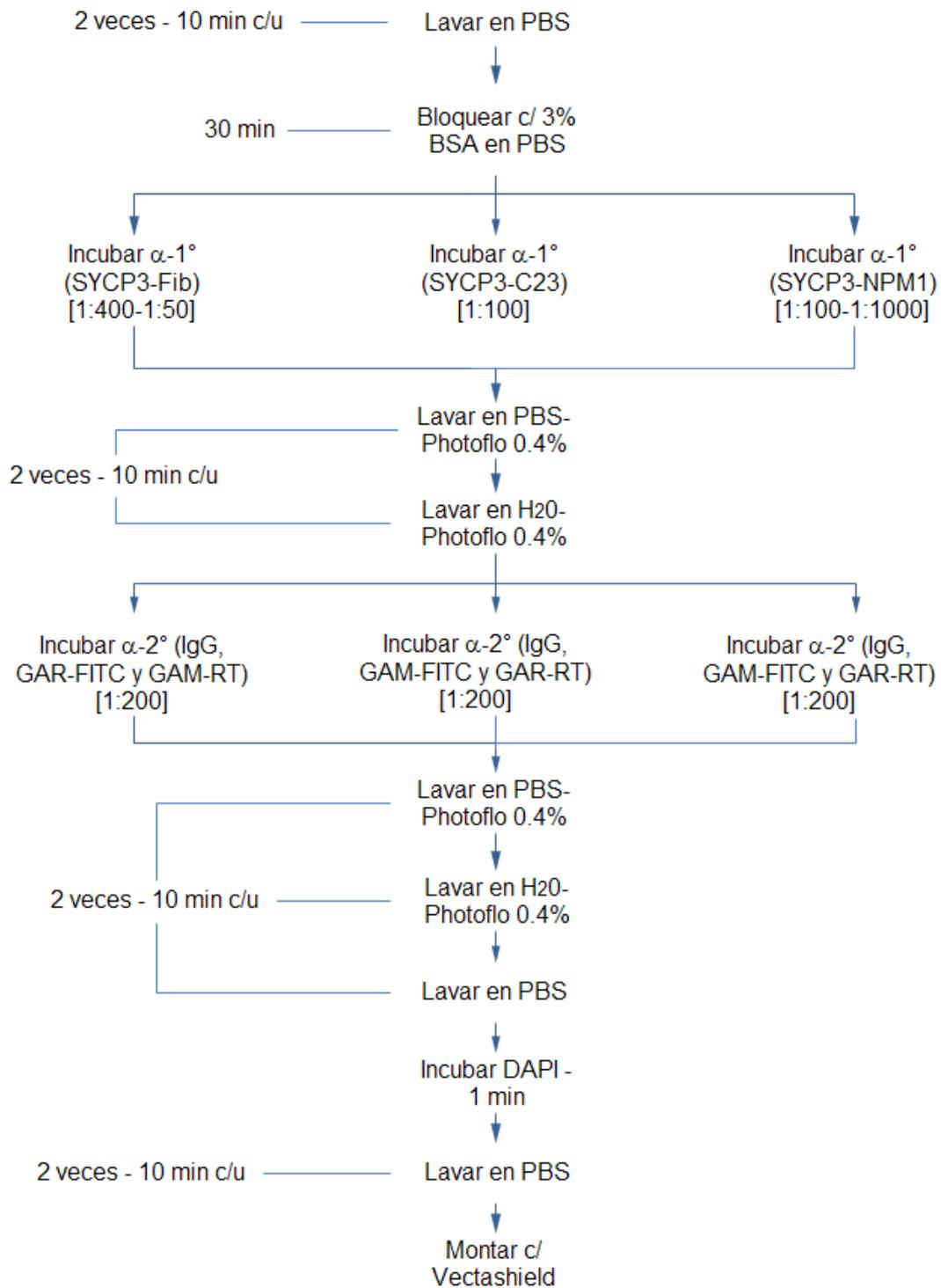


Diagrama de flujo 3. Protocolo de inmunodetección doble de Fibrilarina con Nucleolina y de Fibrilarina con NPM1 en dispersiones.

4) Tablas del análisis estadístico

a. Comparación múltiple de Tukey

Tabla 5. Compilación de datos de la prueba de comparación múltiple de Tukey en las 7 fases del espermatocito primario en profase meiótica I.

Prueba de comparación múltiple	Media 1	Media 2	Diferencia de medias	95% intervalo de confianza	¿Significativo?	Resumen	Valor de p ajustado	N1	N2	Total de cels
Sertoli	1	-	-	-	-	-	-	149	-	919
Preleptoteno vs. Leptoteno	3,500	3,348	0,1517	-0,2423 to 0,5456	No	ns	0,9403	82	89	919
Leptoteno vs. Cigoteno	3,348	2,549	0,7993	0,4260 to 1,173	Si	****	< 0,0001	89	102	919
Cigoteno vs. Paquiteno temprano	2,549	2,885	-0,3360	-0,7116 to 0,03955	No	ns	0,1184	102	87	919
Paquiteno temprano vs. Paquiteno medio	2,885	2,606	0,2788	-0,07941 to 0,6369	No	ns	0,2603	87	127	919
Paquiteno medio vs. Paquiteno tardío	2,606	2,457	0,1497	-0,1511 to 0,4504	No	ns	0,8012	127	173	919
Paquiteno tardío vs. Diploteno	2,457	1,500	0,9566	0,6494 to 1,264	Si	****	< 0,0001	173	118	919

Tabla 6. Compilación de datos de la prueba de comparación múltiple de Tukey en las 5 fases del espermatocito primario en profase meiótica I.

Prueba de comparación múltiple	Media 1	Media 2	Diferencia de medias	95% intervalo de confianza,	¿Significativo?	Resumen	Valor de p ajustado	N1	N2	Total de cels
Sertoli	1	-	-	-	-	-	-	149	-	919
Preleptoteno vs. Leptoteno	3,500	3,348	0,1517	-0,2423 to 0,5456	No	ns	0,9403	82	89	919
Leptoteno vs. Cigoteno	3,348	2,549	0,7993	0,4260 to 1,173	Si	****	< 0,0001	89	102	919
Cigoteno vs. Paquiteno	2,549	2,602	-0,05305	-0,3242 to 0,2181	No	ns	0,9936	102	387	919
Paquiteno vs. Diploteno	2,602	1,500	1,102	0,8459 to 1,358	Si	****	< 0,0001	387	118	919